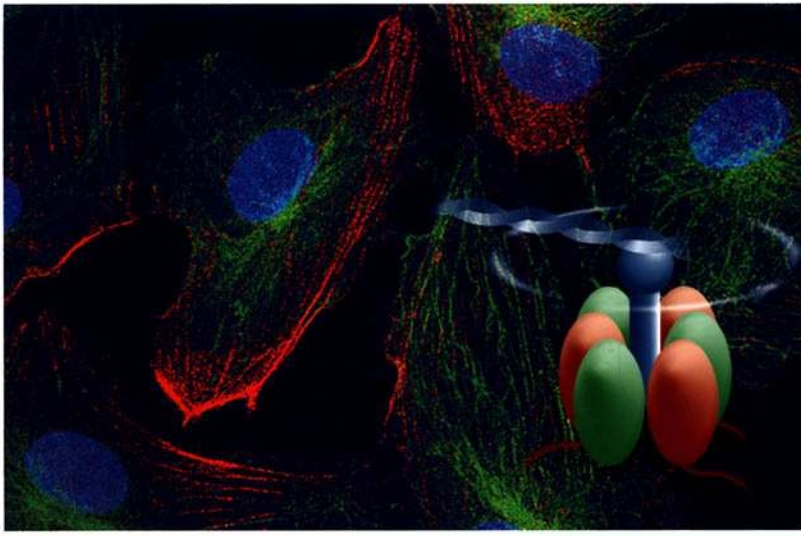
COLLECTION GRENOBLE SCIENCES
DIRIGÉE PAR JEAN BORNAREL

ÉLÉMENTS DE BIOLOGIE

À L'USAGE D'AUTRES DISCIPLINES

DE LA STRUCTURE AUX FONCTIONS

Sous la direction de
Philippe TRACQUI et Jacques DEMONGEOT



EDP SCIENCES

Grenoble Sciences

Grenoble Sciences poursuit un triple objectif :

- réaliser des ouvrages correspondant à un projet clairement défini, sans contrainte de mode ou de programme,
- garantir les qualités scientifique et pédagogique des ouvrages retenus,
- proposer des ouvrages à un prix accessible au public le plus large possible.

Chaque projet est sélectionné au niveau de Grenoble Sciences avec le concours de referees anonymes. Puis les auteurs travaillent pendant une année (en moyenne) avec les membres d'un comité de lecture interactif, dont les noms apparaissent au début de l'ouvrage. Celui-ci est ensuite publié chez l'éditeur le plus adapté.

(Contact : Tél. : (33)4 76 51 46 95 - E-mail : Grenoble.Sciences@ujf-grenoble.fr)

Deux collections existent chez EDP Sciences :

- la ***Collection Grenoble Sciences***, connue pour son originalité de projets et sa qualité
- ***Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques***, collection présentant des thèmes de recherche d'actualité, traités par des scientifiques de premier plan issus de disciplines différentes.

Directeur scientifique de Grenoble Sciences

Jean BORNAREL, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1

Comité de lecture pour "Eléments de biologie"

- **Georgia BARLOVATZ-MEIMON**, Professeur à l'Université de Paris 12
- **Antoine DELON**, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble
- **Michel THELLIER**, Professeur à l'Université de Rouen
- **Paulette VIGNAIS**, Directeur de recherche au CEA de Grenoble
- **Pierre VIGNAIS**, Professeur à l'Université Joseph Fourier de Grenoble

Grenoble Sciences reçoit le soutien
du **Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation nationale et de la Recherche**,
de la **Région Rhône-Alpes**, du **Conseil général de l'Isère**
et de la **Ville de Grenoble**.

Illustration de couverture : **Alice GIRAUD**
d'après un schéma de **Gérard KLEIN** (figure 9, chapitre I) et une photo d'**Alain DUPERRAY**
(Cytosquelette d'une cellule endothéliale prise en microscopie de fluorescence :
les noyaux sont colorés en bleu, les filaments d'actine en rouge et les microtubules en vert).

ISBN 2-86883-587-2
© EDP Sciences, 2003

ÉLÉMENTS DE BIOLOGIE
À L'USAGE D'AUTRES DISCIPLINES

DE LA STRUCTURE AUX FONCTIONS

Sous la direction de

Philippe TRACQUI et Jacques DEMONGEOT

EDP SCIENCES

17, avenue du Hoggar
Parc d'Activité de Courtabœuf, BP 112
91944 Les Ulis Cedex A, France

Ouvrages Grenoble Sciences édités par EDP Sciences

Collection Grenoble Sciences

Chimie. Le minimum à savoir *(J. Le Coarer)* - Electrochimie des solides *(C. Déportes et al.)* - Thermodynamique chimique *(M. Oturan & M. Robert)* - Chimie organo-métallique *(D. Astruc)*

Introduction à la mécanique statistique *(E. Belorizky & W. Gorecki)* - Mécanique statistique. Exercices et problèmes corrigés *(E. Belorizky & W. Gorecki)* - La symétrie en mathématiques, physique et chimie *(J. Sivardière)* - La cavitation. Mécanismes physiques et aspects industriels *(J.P. Franc et al.)* - La turbulence *(M. Lesieur)* - Magnétisme : I Fondements, II Matériaux et applications *(sous la direction d'E. du Trémolet de Lacheisserie)* - Du Soleil à la Terre. Aéronomie et météorologie de l'espace *(J. Lilensten & P.L. Blelly)* - Sous les feux du Soleil. Vers une météorologie de l'espace *(J. Lilensten & J. Bornarel)* - Mécanique. De la formulation lagrangienne au chaos hamiltonien *(C. Gignoux & B. Silvestre-Brac)* - La mécanique quantique. Problèmes résolus, Tomes 1 et 2 *(V.M. Galitsky, B.M. Karnakov & V.I. Kogan)* - Analyse statistique des données expérimentales *(K. Protassov)*

Exercices corrigés d'analyse, Tomes 1 et 2 *(D. Alibert)* - Introduction aux variétés différentielles *(J. Lafontaine)* - Analyse numérique et équations différentielles *(J.P. Demailly)* - Mathématiques pour les sciences de la vie, de la nature et de la santé *(F. & J.P. Bertrandias)* - Approximation hilbertienne. Splines, ondelettes, fractales *(M. Attéia & J. Gaches)* - Mathématiques pour l'étudiant scientifique, Tomes 1 et 2 *(Ph.J. Haug)*

Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques *(J. Pelmont)* - Enzymes. Catalyseurs du monde vivant *(J. Pelmont)* - La plongée sous-marine à l'air. L'adaptation de l'organisme et ses limites *(Ph. Foster)* - L'ergomotricité. Le corps, le travail et la santé *(M. Gendrier)* - Endocrinologie et communications cellulaires *(S. Idelman & J. Verdetti)*

L'Asie, source de sciences et de techniques *(M. Soutif)* - La biologie, des origines à nos jours *(P. Vignais)* - Naissance de la physique. De la Sicile à la Chine *(M. Soutif)*

Minimum Competence in Scientific English *(J. Upjohn, S. Blattes & V. Jans)* - Listening Comprehension for Scientific English *(J. Upjohn)* - Speaking Skills in Scientific English *(J. Upjohn, M.H. Fries & D. Amadis)*

Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques

Radiopharmaceutiques. Chimie des radiotraceurs et applications biologiques *(sous la direction de M. Comet & M. Vidal)* - Turbulence et déterminisme *(sous la direction de M. Lesieur)* - Méthodes et techniques de la chimie organique *(sous la direction de D. Astruc)*

LES AUTEURS

Philippe TRACQUI, chargé de recherche au CNRS, est responsable de l'équipe *Dynamique Cellulaire (DynaCell)* dans le laboratoire TIMC-IMAG, UMR du CNRS. Il a participé à la mise en place de différents enseignements pluri-disciplinaires, en particulier à l'université Joseph Fourier de Grenoble. Ses recherches expérimentales et théoriques actuelles concernent des processus morphogénétiques associés aux interactions mécaniques cellules-matrice extracellulaire. Il est lauréat 2001 du prix GRAMMATICAKIS-NEUMAN de l'Académie des sciences pour ses travaux en mathématiques appliquées à la biologie.

Jacques DEMONGEOT, professeur à la faculté de médecine, est responsable du département d'*Information médicale* au CHU de Grenoble, membre de l'Institut universitaire de France et directeur, à l'UJF, de l'école doctorale *Ingénierie pour le vivant*. Il dirige une UMR du CNRS, le laboratoire TIMC-IMAG (*Techniques de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition*), rattaché à l'Institut d'Informatique et de Mathématiques Appliquées de Grenoble. Ses travaux de recherche actuels portent, entre autres, sur les propriétés de réseaux de gènes, les points de fragilité chromosomiques et le contrôle de la gastrulation.

Gérard KLEIN est directeur de recherche au CNRS. Il s'intéresse aux processus de différenciation et de développement chez l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum* pour décrypter les mécanismes ancestraux de la mort cellulaire programmée.

Michel SATRE, directeur de recherche au CNRS, est responsable d'une unité mixte de recherche CEA - CNRS et université Joseph Fourier de Grenoble. Ses travaux de recherche actuels portent sur l'endocytose et l'adhérence cellulaire en utilisant les atouts génétiques et biochimiques d'un organisme modèle, l'amibe sociale *Dictyostelium discoideum.*

Olivier COHEN est professeur en informatique médicale à la faculté de médecine et médecin généticien au CHU de Grenoble. Il est le créateur et le responsable de la plate-forme HC Forum, dédiée au recueil des données de patients atteints de maladies génétiques.

Didier GRUNWALD est chercheur au CEA, spécialiste en cytométrie de flux, en particulier dans ses applications concernant le cycle cellulaire et la cytogénétique. Il est responsable de la plate-forme d'imagerie cellulaire dans le département DRDC *(Réponse et Dynamique Cellulaires)* du CEA de Grenoble.

Xavier RONOT est directeur d'études à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Il consacre sa recherche depuis de nombreuses années à l'analyse de la prolifération cellulaire au moyen de marqueurs fluorescents vitaux associés aux méthodes de cytométrie.

Pierre-Simon JOUK est professeur de génétique à la faculté de médecine et médecin généticien au CHU de Grenoble. Son domaine de recherche et d'activité clinique est essentiellement celui des malformations et des pathologies du développement.

Alain DUPERRAY est directeur de recherche à l'INSERM. Ses recherches portent sur les mécanismes moléculaires impliqués lors du passage des globules blancs (inflammation) et des cellules cancéreuses (dissémination des métastases) à travers la paroi vasculaire.

Marie Madeleine GIRAUD GUILLE est biologiste, directrice d'études à l'Ecole Pratique des Hautes Etudes. Elle dirige l'équipe *Matériaux du vivant* du laboratoire de *Chimie de la matière condensée* à l'université Pierre & Marie Curie de Paris. Ses thèmes de recherche portent sur les tissus squelettiques, les analogues biologiques des cristaux liquides et les substituts tissulaires.

Jean-Pierre MAZAT, professeur à l'université de Bordeaux 2, est responsable du laboratoire *Physiologie mitochondriale*, qui développe des approches théoriques et expérimentales pour comprendre le rôle des mitochondries dans la bioénergétique cellulaire normale et pathologique.

Alain BARDOU est directeur de recherche à l'INSERM de Rennes. Spécialiste de l'électrophysiologie cardiaque, il a participé, dès la fin des années 1960, au développement du premier service hospitalier de réanimation et de stimulation cardiaque en Europe. On lui doit un important travail de recherche clinique, expérimental et également théorique sur la fibrillation ventriculaire.

Patrick MOUCHET est maître de conférence et praticien hospitalier à la faculté de médecine de Grenoble. Il s'intéresse essentiellement au traitement de l'information dans le système nerveux, principalement par le biais des relations structure-fonction, à partir d'études neuro-anatomiques et de la modélisation des neurones des ganglions de la base chez le primate.

Avec la collaboration de

James TABONY, chercheur au CEA de Grenoble, spécialiste reconnu pour ses travaux de recherche sur l'organisation des microtubules et l'action des champs externes sur la mise en place du cytosquelette.

Nicolas GLADE, post-doctorant au CEA de Grenoble, est l'auteur d'une dizaine d'articles récents, expérimentaux et théoriques, sur le rôle de la gravité dans l'organisation du cytosquelette.

AVANT-PROPOS

Dans un texte sur l'interdisciplinarité [1], Edgar MORIN affirmait : ... *la « révolution biologique » des années 1950 est née d'empiétements, de contacts, de transferts entre disciplines aux marges de la physique, de la chimie, et de la biologie. Ce sont des physiciens comme SCHRÖDINGER qui ont projeté sur l'organisme biologique les problèmes de l'organisation physique. Puis des chercheurs marginaux ont essayé de déceler l'organisation du patrimoine génétique à partir des propriétés chimiques de l'ADN. On peut dire que la biologie moléculaire est née de concubinages « illégitimes ». Elle n'avait aucun statut disciplinaire dans les années 1950 et n'en a acquis un en France qu'après les prix NOBEL de MONOD, JACOB et LWOFF [2]. Cette biologie moléculaire s'est alors autonomisée, puis elle a eu à son tour tendance à se clore, voire même à devenir impérialiste, mais ceci, comme diraient CHANGEUX et KIPLING, est une autre histoire.*

De fait, l'accélération de l'accumulation massive des données en biologie, la limite réductionniste atteinte par le séquençage des génomes et la remontée génome-transcriptome-protéome engagée aujourd'hui montrent que la biologie seule ne viendra pas à bout de la complexité du vivant. Le décloisonnement des disciplines, l'émergence de thématiques et de champs disciplinaires nouveaux sont des nécessités clairement reconnues aujourd'hui, en particulier par les grands organismes de recherches nationaux.

Comment alors assurer le dialogue entre biologistes, mathématiciens, physiciens, informaticiens... ? Comment passer de la pluridisciplinarité, rencontre autour d'un thème commun entre enseignants et chercheurs de disciplines distinctes, mais où chacun conserve la spécificité de ses concepts et méthodes, à l'interdisciplinarité, qui suppose un dialogue et l'échange de connaissances, de concepts et de méthodes entre deux ou plusieurs disciplines ?

Le but de cet ouvrage est de contribuer au développement de l'interdisciplinarité en proposant au lecteur non-biologiste un ensemble limité mais pertinent des connaissances nécessaires pour comprendre les fondements et les enjeux actuels des recherches en biologie animale et en médecine.

L'originalité de ce livre se situe à plusieurs niveaux. C'est d'abord un ouvrage collectif, rédigé par des auteurs biologistes, médecins, mais aussi mathématiciens,

---

1. E. MORIN - Sur l'interdisciplinarité. *Bulletin Interactif du Centre International de Recherches et Etudes transdisciplinaires* **2** (Juin 1994).

2. en 1965.

ayant une pratique concrète de l'interdisciplinarité dans leurs activités de recherche et d'enseignement. D'autre part, la présentation sélective des thèmes traités dans cet ouvrage est proposée dans une perspective intégrative de la biologie animale, qui part de la structure de la cellule pour amener le lecteur à découvrir l'organisation dynamique de quelques grandes fonctions physiologiques comme les fonctions cardiaques et neuronales. Enfin, notre souci a été de mettre en avant aussi souvent que possible, dans les chapitres mais surtout par le biais d'annexes spécifiques, un éclairage et un prolongement des connaissances qui puisse renvoyer le lecteur physicien ou mathématicien à un savoir et à des questions familières dans sa discipline d'origine.

Ainsi, le chapitre VII *La cinétique enzymatique et le contrôle des flux* apparaîtra comme le plus mathématique, tandis que le chapitre VI *Matrices extracellulaires* sera plus familier au physicien à travers les analogies proposées avec les cristaux liquides. Il en est de même pour les phénomènes de propagation d'onde et de conductivité électrique présentés dans les derniers chapitres non seulement d'un point de vue fondamental (chapitre VIII *Eléments d'électrophysiologie)*, mais également dans des contextes physiologiques (chapitre X *Eléments de neurophysiologie*) et pathologiques (chapitre IX *Eléments de physiologie et de physiopathologie cardiaques*).

Nous avons proposé une hiérarchisation des connaissances qui se veut attractive, en partant de la structure de la cellule (chapitre I *Compartimentation cellulaire*) et de son matériel héréditaire (chapitre II *Eléments de génétique moléculaire*) pour aller vers une dynamique cellulaire qui s'exprime dans le temps (chapitre III *Croissance et multiplication cellulaire*) et dans l'espace (chapitre IV *Morphogènes et champs morphogénétiques*), afin de mettre en œuvre un ensemble d'interactions et de voies de signalisation (chapitre V *Molécules d'adhérence et signalisation cellulaire*) qui s'expriment au sein d'un milieu extracellulaire organisé (chapitre VI *Matrices extracellulaires*) pour définir la forme et la fonction d'un tissu ou d'un organe. Une trame commune a été définie pour chaque chapitre, qui commence par une mise en perspective historique du sujet et se termine par des développements plus récents ou la présentation d'axes de recherche.

Les limites *a priori* de ce type d'ouvrage, qui touche à la fois la biologie moléculaire, la biologie cellulaire et la physiologie, sont évidentes : il existe différents livres traitant en détail les différents aspects évoqués ici, dont le fameux *Biologie moléculaire de la cellule*, dont les rééditions successives (la quatrième cette année !) jalonnent le parcours des étudiants et chercheurs biologistes. Le pari qui est fait ici est de proposer au non-spécialiste une approche plus synthétique et plus systémique le conduisant à une première familiarisation avec les « acteurs » biologiques à l'œuvre, les moyens d'étude et la terminologie utilisée. Ces connaissances permettront ensuite au lecteur une immersion plus facile dans la lecture d'ouvrages ou d'articles scientifiques spécialisés, dont certains sont indiqués en complément dans la bibliographie de chaque chapitre.

Nous espérons que le lecteur mathématicien, physicien, informaticien..., qu'il soit étudiant en 2e ou 3e cycle, enseignant ou chercheur, trouvera dans ce livre de quoi asseoir et nourrir ses discussions avec les biologistes. Nous espérons aussi que cet ouvrage pourra lui permettre d'identifier plus précisément des domaines de recherche et d'application où les compétences acquises dans sa formation d'origine pourront être utilisées avec profit dans ses collaborations actuelles ou futures avec des biologistes et des médecins. Certaines parties de l'ouvrage, qui renvoient à des domaines de connaissance plus spécialisés et récents, pourront également compléter les connaissances d'un lecteur biologiste.

Réalisé dans le prolongement d'une école de biologie théorique soutenue par la formation permanente du CNRS et par la **S**ociété **F**rancophone de **B**iologie **T**héorique[3], nous espérons que cet ouvrage constituera un outil pédagogique apprécié par les étudiants, enseignants et chercheurs qui s'engagent aujourd'hui dans des travaux interdisciplinaires en biologie.

Nous tenons également à remercier nos collègues du comité de lecture pour leurs remarques et propositions très constructives.

Philippe TRACQUI et Jacques DEMONGEOT

3. http://www.necker.fr/sfbt/

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

SOMMAIRE

I **COMPARTIMENTATION CELLULAIRE** 13
Gérard KLEIN - Michel SATRE

II **ELÉMENTS DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE : LE MATÉRIEL HÉRÉDITAIRE** 31
Olivier COHEN - Jacques DEMONGEOT

Annexe II-1 - Jacques DEMONGEOT
L'expérience princeps de MILLER et l'ARN archétypal

Annexe II-2 - Jacques DEMONGEOT
Notion de réseau de régulation génétique

III **CROISSANCE ET MULTIPLICATION CELLULAIRE** 73
Didier GRUNWALD - Xavier RONOT

IV **MORPHOGÈNES ET CHAMPS MORPHOGÉNÉTIQUES** 93
Pierre-Simon JOUK

Annexe IV - Philippe TRACQUI
Information positionnelle, gradient morphogénétique et modèles de réaction-diffusion

V **MOLÉCULES D'ADHÉRENCE ET SIGNALISATION CELLULAIRE** 125
Alain DUPERRAY

Annexe V-1 - James TABONY - Nicolas GLADE
Auto-organisation biologique et structures hors-équilibre : l'exemple des microtubules

Annexe V-2 - Philippe TRACQUI - Caractérisation des forces de traction cellulaires

Annexe V-3 - Alain DUPERRAY - Les moteurs moléculaires

VI **MATRICES EXTRACELLULAIRES**
ANALOGUES BIOLOGIQUES DE CRISTAUX LIQUIDES 157
Marie Madeleine GIRAUD GUILLE

VII **CINÉTIQUE ENZYMATIQUE ET CONTRÔLE DES FLUX** 175
Jean-Pierre MAZAT

Annexe VII - Jean-Pierre MAZAT
Principales linéarisations de l'équation de MICHAELIS-HENRI

VIII **ELÉMENTS D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE** 207
Alain BARDOU

IX **ELÉMENTS DE PHYSIOLOGIE ET DE PHYSIOPATHOLOGIE CARDIAQUES** 227
Alain BARDOU

Annexe IX - Alain BARDOU
Simulation d'ondes de propagation et fibrillation ventriculaire

X **ELÉMENTS DE NEUROPHYSIOLOGIE** 253
Patrick MOUCHET

Annexe X - Patrick MOUCHET
Rôle fonctionnel de la connectivité et des coordinations neuronales dans un système sensoriel : exemple du premier relais des voies olfactives

GLOSSAIRE 291
Les mots figurant dans le glossaire sont indiqués en gras dans le texte

INDEX 313

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

Chapitre I

COMPARTIMENTATION CELLULAIRE

Gérard KLEIN - Michel SATRE

Depuis la formulation de la théorie cellulaire, habituellement attribuée au botaniste Matthias Jakob SCHLEIDEN et au zoologiste Theodor SCHWANN (1839), il est reconnu que **la cellule est l'unité de base du monde vivant**. C'est l'entité structurée la plus simple qui a les fonctions caractéristiques de la vie et les travaux de recherche dans les différents domaines de la biologie ont mis en évidence les principes généraux d'organisation et de fonctionnement des cellules [1].

Les organismes vivants se classent en deux catégories selon la complexité de l'agencement de leur matériel génétique : les **eucaryotes**, dont les cellules ont un noyau, et les **procaryotes**, dont les cellules n'en possèdent pas. Malgré leur extrême variété de taille ou de forme, tous les êtres vivants, de la **bactérie** à la baleine, sont apparentés dans leur composition chimique, leur plan et leurs fonctions. Comme l'a souligné le biologiste André LWOFF [2] : *...quand le monde vivant est considéré au niveau cellulaire, on découvre l'unité* [LWOFF, 1969].

Les eucaryotes vont de micro-organismes simples, comme les amibes ou les levures, jusqu'aux êtres les plus complexes, plantes ou animaux. Les eucaryotes partagent un grand nombre de caractéristiques fondamentales et les découvertes faites pour une espèce donnée s'appliquent le plus souvent directement à beaucoup d'autres. Les eucaryotes multicellulaires sont composés de différentes sortes de cellules spécialisées qui dépendent alors les unes des autres pour survivre au sein d'un organisme. Cette dépendance est relative car la plupart des cellules possèdent tout ce qui est indispensable pour vivre et se multiplier, sous une forme isolée et complètement séparée de leur organisme d'origine, si elles sont mises dans un environnement qui procure les nutriments, hormones et facteurs de croissance appropriés. Ainsi, la compréhension du fonctionnement normal ou pathologique des organismes complexes passe par l'analyse du fonctionnement de la cellule unitaire.

---

1. Les bases historiques de la biologie sont présentées dans l'ouvrage de Pierre VIGNAIS *La biologie des origines à nos jours. Une histoire des idées et des hommes,* 478 p., EDP Sciences (2001).
2. André WOLFF a reçu le prix NOBEL de Médecine en 1965, conjointement avec François JACOB et Jacques MONOD. Leurs découvertes ont jeté les bases de la biologie moléculaire.

En pratique, l'utilisation des cultures de cellules a d'ores et déjà permis de réduire l'emploi des animaux pour des recherches fondamentales en toxicologie ou physiologie. En médecine, la thérapie cellulaire est en phase de développement. Les cellules « souches » embryonnaires ou adultes qui sont capables de spécialisation et de prolifération laissent entrevoir des possibilités de remplacement de tissus et même d'organes malades ou endommagés [THOMSON *et al.*, 1998].

Les procaryotes, ou **bactéries** dans l'acception courante, se divisent en deux groupes séparés : les eubactéries et les archae (archaebactéries). Ces dernières vivent dans des environnements hostiles pour l'homme : absence d'oxygène (méthanogènes), forte concentration en sels (halophiles), températures élevées pouvant dépasser 100°C (thermophiles) et pH très acide (acidophiles). Les bactéries pathogènes qui nous entourent sont des eubactéries.

Portée par l'accumulation des données des séquençages génomiques et les progrès de la bio-informatique, l'étude de l'évolution est actuellement un sujet de premier plan et les résultats des analyses phylogénétiques montrent les parentés entre organismes et donnent des éclairages nouveaux sur les processus biologiques (figure 1).

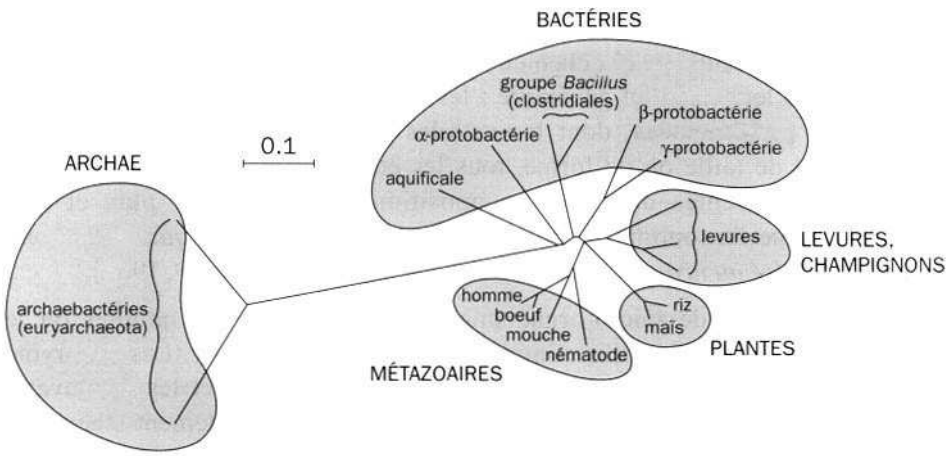


Figure 1 - Phylogénie des organismes vivants : l'exemple de la sous-unité catalytique de l'ATPase de type F1-Fo

Cet arbre phylogénétique regroupe une sélection de 18 espèces. Elles ont été classées selon les similitudes dans les séquences de la sous-unité catalytique de l'ATPase de type F1-Fo, une **protéine** qui catalyse réversiblement la synthèse ou l'hydrolyse de l'ATP (voir § 2.3.1) et dont la fonction bioénergétique est bien conservée dans tous les organismes. Une séparation nette est apparente entre les animaux pluricellulaires ou métazoaires (mammifères, insectes, nématodes), les plantes, les levures puis les bactéries et les archae (archaebactéries). La distance des branches entre deux entrées correspond directement à leur éloignement évolutif. La barre d'échelle des distances correspond au nombre moyen de substitution d'acide aminé par position de séquence. Il est possible de combiner les données provenant de la comparaison des séquences de plusieurs protéines et de l'ARN ribosomique. Pour une discussion détaillée, voir [DOOLITTLE, 2000].

La vie est apparue sur la terre voilà 3,5 à 4 milliards d'années, d'abord dans les océans puis les continents ont été colonisés par des micro-organismes dont l'empilement en couches a formé un sol organique. Un scénario, qui s'appuie beaucoup sur les données de la biologie moléculaire, fait dériver toutes les cellules actuelles de communautés ancestrales d'entités primitives qui, progressivement, ont donné naissance aux organismes contemporains. Il y a 2 milliards d'années, les eucaryotes étaient déjà présents et, selon l'hypothèse endosymbiotique [LANG *et al.*, 1999], ils ont acquis les ancêtres des mitochondries et plastes actuels par la séquestration de bactéries qui sont ensuite devenues résidentes chez l'hôte (figure 2).

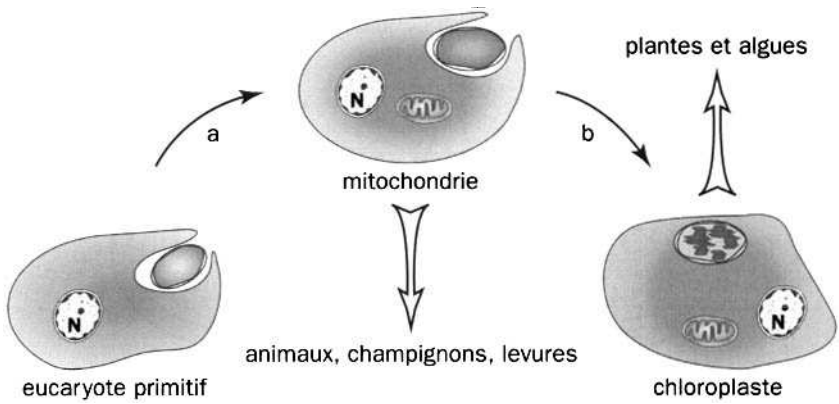


Figure 2 - Hypothèse endosymbiotique
Les mitochondries se sont formées après qu'une cellule eucaryote nucléée ancestrale ait englobé par phagocytose des bactéries qui ont pu persister dans le cytoplasme (**a**). Elles ont perdu leur autonomie en transférant la majeure partie de leur patrimoine génétique vers le noyau de l'hôte. Cette cellule eucaryote, possédant alors des mitochondries, va donner naissance aux animaux, champignons et levures. Ultérieurement, un mécanisme similaire mettant en jeu une **cyanobactérie** (**b**) a permis l'acquisition des chloroplastes et l'émergence de la lignée ancêtre des plantes et algues actuelles.

Ce chapitre va présenter les grandes lignes de l'organisation des cellules pro- et eucaryotes. L'exemple des mitochondries et des lysosomes a été choisi pour intégrer la compartimentation eucaryote dans la physiologie cellulaire.

1. ORGANISATION DES PROCARYOTES

Par leur croissance rapide, leur grande adaptabilité, la facilité de leur analyse génétique et leur relative simplicité, les **bactéries** sont un matériel de choix pour l'étude de la cellule, de ses fonctions physiologiques et de leurs régulations. C'est dans les années 1930 que les travaux des physiologistes et des biochimistes vont unir la biologie des procaryotes à celle des autres organismes. Au cours de la décennie 1990, la microbiologie cellulaire s'est imposée comme une discipline de base de la biologie moderne [COSSART *et al.*, 2000].

Les bactéries ont le plus souvent une petite taille (longueur moyenne de 0,5 à 1,5 µm). Elles sont divisées en deux classes en fonction de leur réponse à une méthode de coloration développée empiriquement par le microbiologiste danois Christian GRAM en 1884 : les bactéries Gram-positives sont de couleur violette et les bactéries Gram-négatives sont roses.

Les bactéries Gram-positives, comme les streptocoques, *Listeria* ou pneumocoques, ont deux barrières : la paroi et la membrane plasmique (figure 3). Les organismes Gram-négatifs, comme le colibacille *Escherichia coli* ou la bactérie gastrique *Helicobacter pylori*, ont en plus une membrane externe phospholipidique qui est perméable à la plupart des petites molécules de taille inférieure à 5 000 **daltons** (Da). La paroi se situe alors entre les deux membranes.

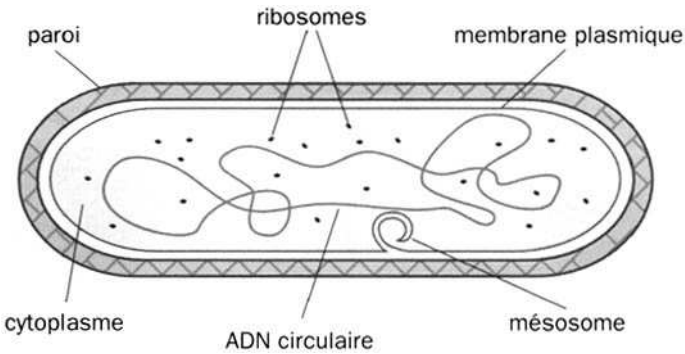


Figure 3 - Schéma de l'organisation d'une bactérie Gram-positive
La bactérie est entourée par une paroi externe et par une membrane phospholipidique (**membrane plasmique**) qui peut se replier pour donner des mésosomes. Le **cytoplasme** contient l'**ADN** et il est riche en **ribosomes** qui participent à la synthèse des protéines.

La paroi est une structure polymérique constituée principalement par des sucres et des acides aminés liés de façon covalente pour former un assemblage de peptidoglycanes (complexes de protéines et d'oligosaccharides). La pénicilline, découverte par Alexander FLEMING, est un antibiotique qui tue les bactéries en inhibant la synthèse de leurs parois d'où son action curative dans certaines maladies infectieuses. La pression osmotique intracellulaire étant supérieure à celle du milieu, les bactéries traitées, dont les parois fragilisées ne résistent plus à la différence de pression, vont gonfler par entrée d'eau et éclater.

La **membrane plasmique** bactérienne constitue la vraie frontière avec le milieu extérieur. Formée d'une **bicouche phospholipidique**, elle est relativement perméable aux composés hydrophobes, aux gaz et à l'eau. Par contre, elle est imperméable à la plupart des composés que la cellule doit échanger avec son environnement : ions (Cl^-, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}...), sucres ou acides aminés. La membrane plasmique bactérienne contient des protéines de transport et de passage transmembranaire, qui permettent à tous les composés indispensables d'entrer ou de sortir de la bactérie. Le modèle classique d'organisation des lipides et des

protéines dans la membrane biologique est de type « mosaïque fluide » [SINGER & NICOLSON, 1972] et des protéines intégrales sont insérées dans la bicouche phospholipidique ou associées de manière périphérique (interactions protéine-protéine, ancrages spécifiques...). La bicouche phospholipidique est plus qu'un solvant à deux dimensions et elle module souvent la fonction des protéines membranaires ou périphériques.

L'**ADN circulaire** des bactéries est rassemblé dans le cytoplasme qui contient également de nombreux **ribosomes**, la machinerie de synthèse protéique. Les ribosomes catalysent une réaction chimique simple qui est de former des liaisons amide. Leur tâche cruciale est de choisir sans erreur les acides aminés qui s'ajoutent à la chaîne polypeptidique naissante en lisant les codons successifs sur l'**ARN messager**. Le ribosome bactérien est constitué par 3 molécules d'ARN et plus de 50 protéines. Il s'organise en deux sous-unités (voir chapitre II, § 7). L'ARN de la grosse sous-unité a une fonction catalytique [3] : c'est un ribozyme [CECH, 2000].

Les maladies infectieuses provoquées par les bactéries restent une cause majeure de morbidité et de mortalité. Le problème est aggravé par divers facteurs comme la résistance de plus en plus fréquente à un éventail d'antibiotiques, l'émergence de nouveaux pathogènes ou le retour des pathogènes anciens, ainsi que par le manque de thérapeutiques innovantes et efficaces. Les séquences complètes de plus de 30 **génomes** bactériens sont connues à ce jour et plusieurs centaines seront disponibles dans les prochaines années. Ceci va donner de meilleures possibilités pour comprendre les éléments moléculaires de la virulence microbienne et développer rationnellement de nouvelles classes d'antibiotiques.

2. *LES EUCARYOTES ONT UNE STRUCTURATION COMPARTIMENTÉE*

Les cellules eucaryotes ont une taille moyenne de l'ordre de 20-25 µm. Elles sont limitées par la **membrane plasmique**, formée, comme chez les procaryotes, de deux feuillets phospholipidiques. Les plantes, levures et champignons possèdent en plus une paroi rigide recouvrant la membrane plasmique (figure 4).

L'organisation dans le plan de la membrane plasmique est hétérogène et des microdomaines appelés radeaux, regroupent latéralement des glycosphingolipides, des phospholipides avec des acides gras saturés et du cholestérol [PRALLE *et al.*, 2000]. Les fonctions proposées pour les microdomaines concernent les processus de signalisation, l'attachement au **cytosquelette**, la formation de contacts intercellulaires (voir chapitre V) ou la production de vésicules de transport. L'organisation de la phase lipidique est proche de celle d'un **cristal liquide** (voir chapitre VI).

3. La mise en évidence des propriétés catalytiques de l'ARN a valu le prix NOBEL de Chimie à Sidney ALTMAN et Thomas CECH en 1989.

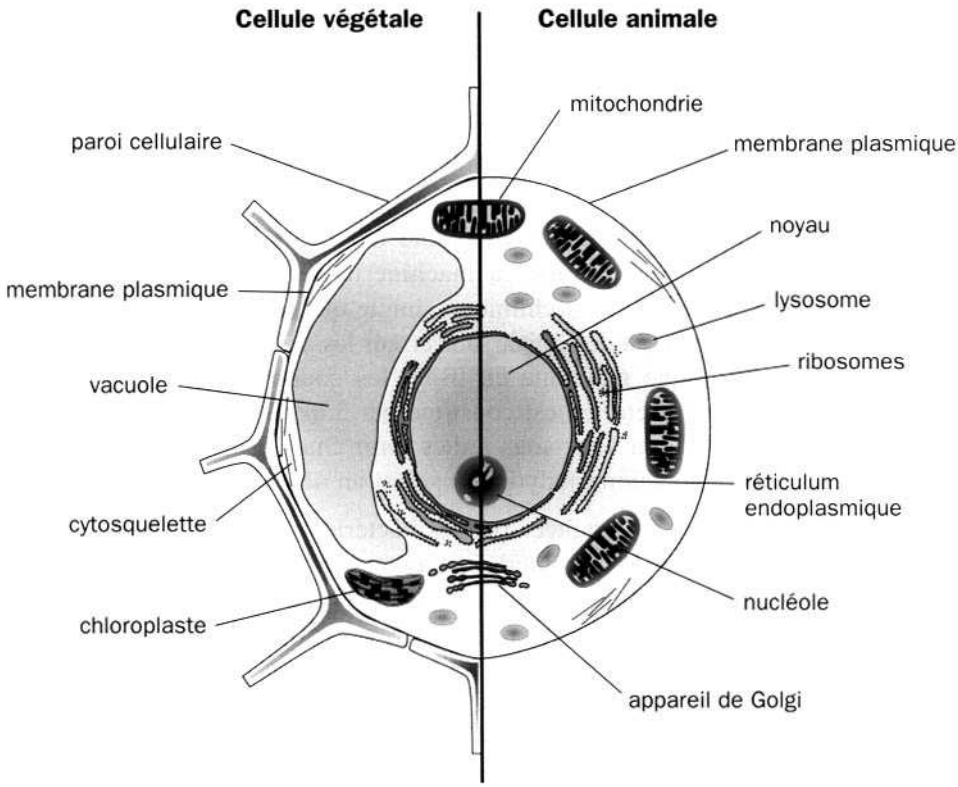


Figure 4 - Schéma d'organisation comparée d'une cellule végétale et d'une cellule animale

Les cellules eucaryotes se caractérisent par une compartimentation subcellulaire qui organise leur espace intérieur autour d'un ensemble de structures membranaires ayant une composition moléculaire qui leur est propre et une fonction métabolique définie. Elles possèdent un noyau, un réseau d'endomembranes (**réticulum endoplasmique**, appareil de GOLGI, lysosome) et des mitochondries. Une paroi cellulosique rigide limite les cellules végétales qui se distinguent de plus par la présence de chloroplastes et d'une vacuole qui occupe une majeure partie du volume cellulaire. La compartimentation membranaire est accompagnée par la mise en place de gradients physico-chimiques (protons, calcium...). Elle varie dans le temps au cours de processus physiologiques comme la division cellulaire ou en réponse à des signaux **exogènes**. Ainsi, la régulation de cette organisation est un élément clé dans le développement cellulaire.

L'intérieur de la cellule eucaryote contient un noyau et divers autres organites. Il est structuré par un ensemble de fibres protéiques qui constituent le **cytosquelette** (voir chapitre V). Les organites définissent une organisation modulaire qui isole, dans l'espace et dans le temps, des réactions métaboliques et des processus qui seraient autrement incompatibles. La capacité à maintenir un grand nombre de compartiments intracellulaires, avec des compositions protéiques et phospholipidiques distinctes, est un trait caractéristique des eucaryotes. Les substances sont transportées d'un endroit à un autre, mais chaque compartiment maintient son identité. Les transports mettent en jeu des navettes vésiculaires et une série de protéines, conservées au cours de l'évolution, qui assurent le bourgeonnement des

vésicules à partir d'un compartiment donneur, le transport lui-même et la fusion avec l'organite cible (figure 5). Les étapes de fusion membranaire impliquent, entre autres, des protéines appelées **SNAREs** dont une particularité structurale essentielle est la présence de domaines organisés en **hélices alpha**.

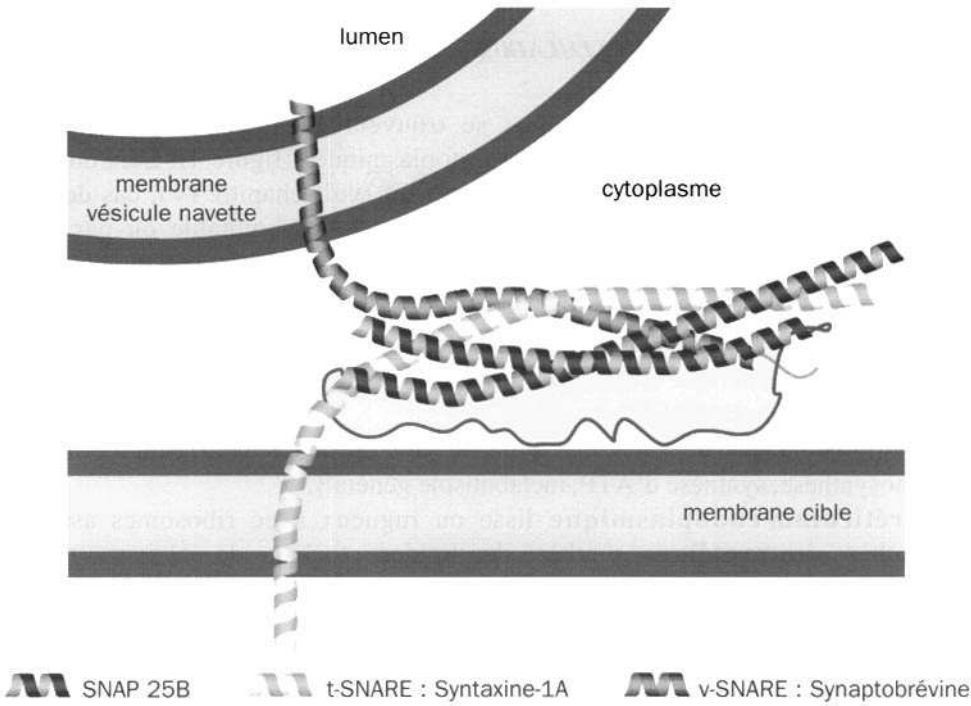


Figure 5 - Fusion membranaire et hypothèse des SNAREs
La sélectivité de l'accostage de la vésicule navette avec son compartiment cible puis la fusion qui assurera le déchargement de la cargaison contenue dans la vésicule sont contrôlées par des protéines transmembranaires, les **SNAREs**. L'acronyme SNARE pour **S**oluble-**N**-ethyl maleimide sensitive factor **A**ttachment Protein **RE**ceptor résume l'histoire de leur identification qui a commencé par celle de NSF (**N**-ethyl maleimide **S**ensitive **F**actor), une ATPase soluble qui va s'associer à une autre protéine cytoplasmique : SNAP (**S**oluble **N**SF **A**ssociated **P**rotein) pour se fixer sur les SNAREs dans la phase de post-fusion membranaire et catalyser leur dissociation. Le schéma représente ici l'accostage d'une vésicule synaptique porteuse de la synaptobrévine, une SNARE vésiculaire, au niveau d'une région active de la membrane plasmique du neurone présynaptique où un complexe en torsade d'hélices se forme avec les deux SNAREs de la membrane cible : la syntaxine 1A et SNAP-25. La SNARE SNAP-25 (pour **Sy**N**a**ptosome-**A**ssociated **P**rotein of **25** kDa) n'a pas de segment transmembranaire mais elle est ancrée par des chaînes palmitoylées (16 atomes de carbone) fixées au milieu de la protéine.

Lors de la fusion membranaire, 4 hélices fournies par des SNAREs localisées à la fois sur les compartiments donneur et accepteur s'assemblent pour former une torsade d'hélices très stable qui rapproche les membranes et assure ainsi la fusion. Associées à d'autres protéines partenaires, les SNAREs constituent de véritables complexes d'étiquetage, essentiels pour garantir la précision indispensable de toutes les étapes du trafic vésiculaire à l'intérieur de la cellule [MAC NEW *et al*,

2000]. Le nombre de SNAREs est variable selon les organismes, sans doute en fonction de la complexité des besoins : de 22 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il augmente à 36 chez l'homme, pour atteindre près de 60 chez la plante *Arabidopsis thaliana*.

2.1. LES ORGANITES INTRACELLULAIRES

De multiples systèmes membranaires se trouvent à l'intérieur de la cellule eucaryote où ils délimitent les organites cytoplasmiques (figure 4). Lors du cycle cellulaire (voir chapitre III) et du développement (voir chapitre IV), ces derniers sont synthétisés par fission (ou fusion) d'un organite semblable ou par bourgeonnement à partir d'un organite différent (mécanismes homo- ou hétérotypiques).

Les compartiments et leur spécificité fonctionnelle principale sont :

- ✓ le noyau entouré par l'enveloppe nucléaire. Il contient la quasi-totalité de l'information génétique (ADN). Le **nucléole** est une sous-structure responsable de la synthèse de l'ARN ribosomique,
- ✓ les mitochondries et, chez les plantes, les plastes (respiration cellulaire, photosynthèse, synthèse d'ATP, métabolisme général),
- ✓ le **réticulum endoplasmique** lisse ou rugueux avec ribosomes associés (synthèse des **protéines**, synthèse des lipides, stockage de calcium...). Il se déploie dans le cytoplasme depuis le noyau,
- ✓ les peroxisomes (métabolisme oxydatif),
- ✓ l'appareil de GOLGI (maturation des protéines et orientation vers le lysosome, la membrane plasmique ou la sécrétion). Présent en un seul exemplaire dans la cellule, il est le plus souvent localisé près du noyau et du **centrosome**, la structure qui organise les microtubules. Il a une organisation typique en pile d'assiettes, spécialement dans les cellules sécrétrices. Son fonctionnement met en jeu du trafic vésiculaire par bourgeonnement et fusion. Dans le mode antérograde, des vésicules passent des compartiments cis-GOLGI (côté noyau et réticulum endoplasmique) vers les compartiments median- et trans-GOLGI,
- ✓ les endosomes, lysosomes et vacuoles (dégradation des macromolécules et de molécules complexes).

2.2. LE FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE

Pour étudier la structure et la fonction métabolique des organites, il est nécessaire de les isoler sous une forme très purifiée et en quantité suffisante. Les méthodologies de fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle (figure 6) ont été développées dès la fin des années 1940 et combinées avec la microscopie électronique pour réaliser les études morphologiques. Les découvertes qui en ont découlé sur l'organisation structurale et fonctionnelle de la cellule eucaryote ont établi les bases de la biologie cellulaire et des chercheurs comme

Christian DE DUVE, Albert CLAUDE et George PALADE ont joué des rôles clés dans ce domaine, reconnus par le prix NOBEL de Médecine en 1974 [BROWERS, 1998 ; FARQUHAR & PALADE, 1998].

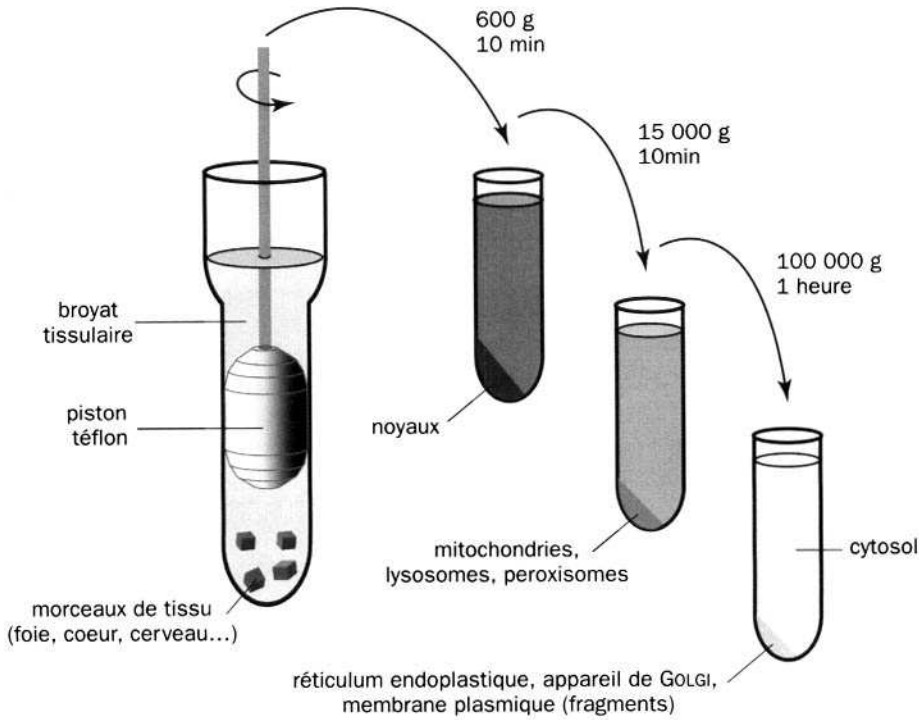


Figure 6 - Fractionnement subcellulaire par centrifugation différentielle
Le fractionnement commence par une rupture contrôlée des cellules placées dans un milieu isotonique (souvent du saccharose 0,25 M (mol/L), pH 7,4) puis continue par des étapes de centrifugation. Les composants intracellulaires ont des tailles et des densités distinctes et sont influencés différemment par la gravité. Une force centrifuge modérée suffit pour collecter les noyaux. Ensuite, une augmentation de la vitesse sédimente ensemble les mitochondries, peroxisomes et lysosomes, et des techniques particulières, comme la centrifugation sur gradient de densité, sont nécessaires pour séparer ces organites. Une ultracentrifugation prolongée donne un culot qui contient les fragments de la membrane plasmique, l'appareil de GOLGI et le **réticulum endoplasmique**. La portion soluble du cytoplasme ou **cytosol** est définie opérationnellement comme étant la fraction non sédimentée.

La pureté des préparations d'organites est déterminée par des examens morphologiques (microscopie électronique) et aussi, par la mesure quantitative de marqueurs appropriés comme, par exemple, l'activité d'enzymes localisées sélectivement dans un type d'organite :

- ✓ mitochondrie : cytochrome c oxydase (membrane interne), monoamine oxydase (membrane externe),
- ✓ lysosome : phosphatase acide, N-acétyl-glucosaminidase,
- ✓ peroxisome : catalase.

Ainsi, par exemple, la **cytochrome c oxydase** est localisée seulement dans les mitochondries et sa présence dans une fraction de lysosomes indiquera une contamination par des mitochondries.

2.3. Le rôle central des mitochondries

Les mitochondries sont le site de la respiration cellulaire et de production d'énergie utilisable par la cellule et stockée sous forme d'adénosine-5'-triphosphate ou **ATP**. Elles ont un double système membranaire qui délimite deux compartiments distincts : la matrice, entourée par la membrane interne et l'espace intermembranaire, compris entre la membrane interne et la membrane externe.

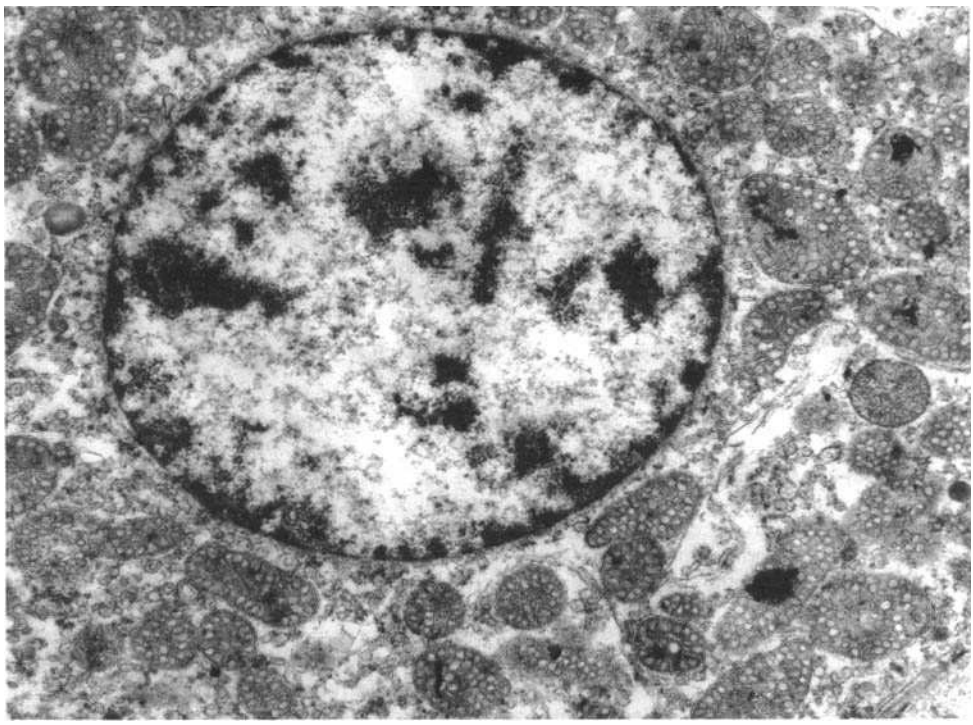


Figure 7 - Microscopie électronique à transmission d'une cellule de la corticosurrénale
La glande est fixée, déshydratée et incluse dans une résine plastique. Des coupes ultra-fines sont traitées avec des ions d'atomes lourds (uranium, plomb) afin de rendre les structures visualisables par le faisceau d'électrons. Dans ce tissu, les mitochondries, présentes en grand nombre, participent activement à la biogenèse des hormones corticostéroïdes. Les repliements de la membrane interne (crêtes) ont une forme tubulo-vésiculaire, caractéristique chez l'homme des glandes endocrines comme les ovaires et les testicules. La surface circulaire au centre du cliché est une section du noyau. Agrandissement : × 20 000.

Certains eucaryotes micro-aérobies qui ne possèdent pas de mitochondries ont des organites apparentés, les hydrogénosomes, qui sont impliqués dans le métabolisme énergétique. Bordé par une double membrane, l'hydrogénosome a une taille

voisine de 1 µm : il ne contient pas d'ADN et il produit de l'ATP [HACKSTEIN *et al.*, 1999]. Il utilise une hydrogénase qui réduit les protons en hydrogène moléculaire. Le système, couplé au complexe enzymatique de la NADH-deshydrogénase (figure 8), génère un gradient de pH et un potentiel de membrane en anoxie.

Un eucaryote pathogène, comme l'amibe *Entamoeba histolytica*, possède des organites apparentés aux hydrogénosomes. L'analyse phylogénétique est en faveur d'un événement endosymbiotique unique au niveau des eucaryotes ancestraux, suivi au cours de l'évolution, par la différenciation en organites distincts [DYALL *et al.*, 2000].

2.3.1. Mitochondries et bioénergétique cellulaire

L'**ATP** est la source d'énergie chimique indispensable à toutes les cellules vivantes pour leur métabolisme et leur croissance. La dégradation aérobie complète d'une molécule de glucose ($C_6H_{12}O_6$) en CO_2 et H_2O est couplée à la synthèse d'une quantité maximale de 32 molécules d'ATP.

Chez les eucaryotes, les étapes initiales de la dégradation du glucose se passent dans le **cytosol** (figure 6) où deux molécules d'ATP sont produites (phosphorylation glycolytique). Ensuite, les étapes qui impliquent l'oxygène ont lieu seulement dans les mitochondries : l'ATP est produit pour plus de 90% par ces organites [SARASTE, 1999]. Le taux de renouvellement de l'ATP est considérable car, de façon continue, les cellules vivantes hydrolysent l'ATP en ADP et phosphate inorganique (Pi) pour récupérer l'énergie libre résultante pour leurs activités : réactions de synthèse, concentration d'ions ou de molécules, déplacement...

Les mitochondries occupent jusqu'à 20-30% du volume du cytoplasme et leur nombre varie entre plusieurs centaines et plusieurs milliers par cellule (par exemple, de l'ordre de 3000 pour l'hépatocyte). Les mitochondries ont une taille semblable à celle des bactéries (1 à 2 µm de long et 0,2 à 0,5 µm de diamètre) et elles ont également un double système membranaire phospholipidique : membrane interne et externe.

Les mitochondries contiennent de l'ADN qui a une taille et une organisation physique très variées mais qui est le plus souvent circulaire, un trait qui le rapproche de celui des bactéries. Cependant, son potentiel de codage est très réduit et l'ADN mitochondrial humain, par exemple, contient 37 gènes et code seulement 13 protéines, toutes associées à l'**oxydation phosphorylante**. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le **génome** nucléaire et sont importées.

La membrane externe des mitochondries est perméable à de petites molécules (masse moléculaire < 5 kDa), car elle possède de la porine, une protéine qui est organisée en pore transmembranaire. Les replis de la membrane interne permettent une augmentation importante de la surface dans un volume donné. La membrane interne est très riche en protéines. Elle contient surtout des transporteurs de molécules anioniques (nucléotides, Pi, métabolites...) et de cations (Ca^{2+}), ainsi

que toutes les **protéines** de la chaîne respiratoire et de l'**ATP synthase** associées au système de l'oxydation phosphorylante (figure 8).

Les transporteurs mitochondriaux de molécules anioniques se répartissent en deux catégories : électroneutres ou électrogéniques. Les échangeurs électroneutres de type antiport : phosphate inorganique (Pi)/OH^-, Pi/malate, malate/citrate, malate/α-cétoglutarate ou pyruvate/OH^- fonctionnent de façon réversible et symétrique. Les transporteurs électrogéniques sont asymétriques, irréversibles et ils requièrent pour fonctionner la présence d'un potentiel de membrane. Le mieux caractérisé est le translocateur ADP/ATP [FIORE *et al.*, 1998]. C'est la protéine majoritaire de la membrane interne mitochondriale et sa masse moléculaire est voisine de 30 kDa. A pH 7, l'ATP et l'ADP ont respectivement 4 et 3 charges négatives. Dans une situation physiologique normale, le transport de l'ADP du cytosol contre de l'ATP de la matrice mitochondriale se produit sans compensation de charge. L'excès de charges négatives du côté cytosolique de la membrane interne crée un potentiel de membrane qui contrecarre le transport si la chaîne respiratoire n'apporte pas de protons. Ainsi, sont garanties des conditions qui imposent l'importation d'ADP dans la mitochondrie et l'exportation d'ATP vers le cytosol (figure 8). Dans le processus de l'oxydation phosphorylante, la cascade de réactions d'oxydo-réduction dans la chaîne respiratoire est couplée à la synthèse d'ATP catalysée par une enzyme complexe : la F1-Fo ATPase.

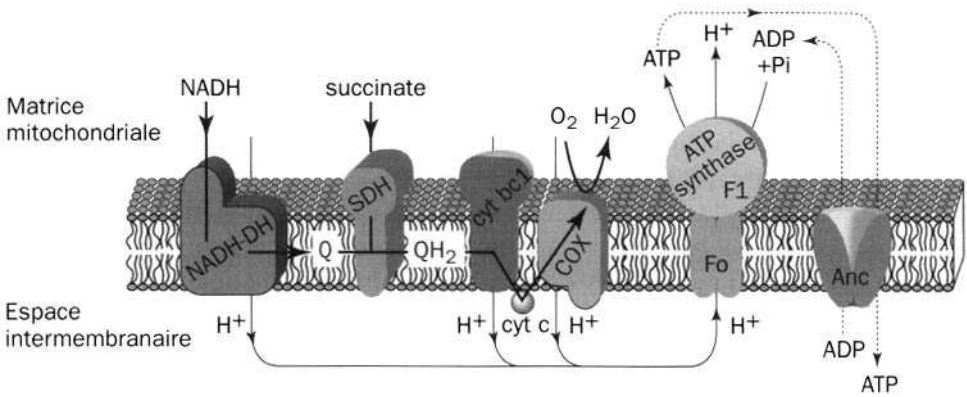


Figure 8 - Schéma de l'organisation des complexes enzymatiques de l'oxydation phosphorylante dans la membrane interne mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale est formée par la NADH deshydrogénase, la succinate deshydrogénase, le cytochrome bc1, le cytochrome c et la cytochrome oxydase. L'ubiquinone, oxydée ou réduite (Q ou QH_2), est une petite molécule soluble et très mobile dans le cœur de la membrane phospholipidique. Le trajet redox en direction de l'oxygène (symbolisé en traits gras) s'accompagne d'une translocation de protons depuis la matrice vers l'espace intermembranaire (traits continus). L'ATP synthase utilise le gradient de protons pour former de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi). Le translocateur des adénines nucléotides (Anc) catalyse l'échange ADP/ATP et alimente l'ATP synthase en ADP tout en exportant l'ATP néo-synthétisé vers l'espace intermembranaire et le cytosol.

L'une des avancées les plus importantes en biologie dans la deuxième moitié du XXe siècle a été la compréhension du couplage énergétique entre la respiration cellulaire et la synthèse de l'ATP. Le mécanisme chimiosmotique, formulé dans les années 1960 par le biochimiste britannique Peter MITCHELL [4], explique que l'énergie d'oxydo-réduction libérée lors du cheminement des électrons dans la chaîne respiratoire allant du **NADH** à l'oxygène sert, grâce à un transfert vectoriel de protons, à établir une force proton-motrice comprenant deux composantes interchangeables : potentiel de membrane et gradient de pH [MITCHELL & MOYLE, 1967 ; MITCHELL, 1979]. Dans la mitochondrie, le mouvement des protons a lieu depuis la matrice mitochondriale vers le **cytosol**. Le retour des protons par le secteur membranaire Fo de l'ATP synthase, est couplé à la formation d'ATP à partir d'ADP et de Pi qui est catalysée par le secteur F1.

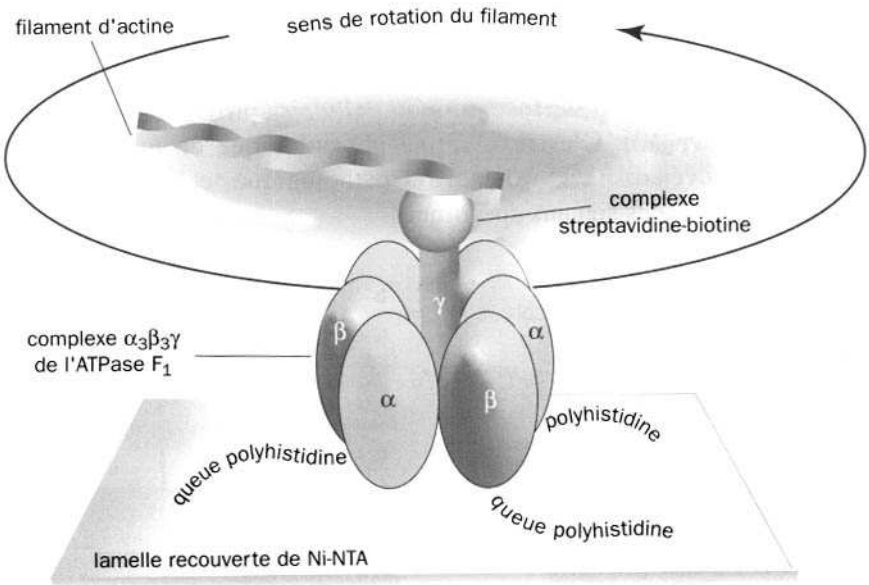


Figure 9 - Un système expérimental pour observer la rotation de l'ATPase-F1
L'enzyme isolée est ancrée à la surface d'une lamelle de verre couverte de nickel (Ni-NTA : Ni^{2+}-nitriloacétate) par l'intermédiaire d'extensions polyhistidine introduites à l'extrémité N-terminale des trois sous-unités β. Un long filament d'**actine** polymérisée, rendu fluorescent par la fixation d'un réactif chimique pour être visible par microscopie optique, est attaché par un couple streptavidine-biotine à l'extrémité de l'axe central de la sous-unité γ. L'addition d'ATP fait tourner le filament d'actine. La comparaison entre l'énergie libre d'hydrolyse de l'ATP et l'énergie de rotation montre que le moteur fonctionne avec une efficacité presque parfaite. Un tel dispositif préfigure des nanomachines du futur où l'enzyme ferait tourner une petite barre métallique, telle une pale d'hélicoptère.

4. Les découvertes en bioénergétique sur les principes de transfert d'énergie et les mécanismes enzymatiques de la synthèse d'ATP ont déjà valu à la discipline deux prix NOBEL de Chimie. Le premier a été attribué à Peter MITCHELL en 1978 et le second partagé par Paul BOYER et John WALKER en 1997.

Les mécanismes moléculaires du fonctionnement de l'ATP synthase ont été clarifiés par la détermination de la structure de cristaux de la partie catalytique F1 de l'enzyme. L'équipe de John WALKER à Cambridge (Angleterre) a réussi ce travail remarquable sur un ensemble protéique de très grande taille (environ 400 kDa), composé de cinq sous-unités différentes (α, β, γ, δ, ε) avec une stœchiométrie $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. L'asymétrie structurale des trois couples α β, une conséquence directe de la présence d'un seul ensemble $\gamma\delta\varepsilon$, est cruciale dans le mode fonctionnement de l'enzyme complet F1-Fo qui se comporte comme un moteur rotatif [BOYER, 1997 ; STOCK *et al.*, 1999 et YASUDA *et al.*, 1998] (voir chapitre V, annexe V-3).

2.3.2. Rôle central des mitochondries dans le contrôle de la mort cellulaire programmée

La mitochondrie a deux visages. D'une part, elle est la source d'énergie métabolique sous la forme de l'ATP, indispensable à la vie. D'autre part, elle contrôle un processus létal mais néanmoins crucial pour le développement normal des organismes multicellulaires : l'**apoptose** ou mort cellulaire programmée [KROEMER & REED, 2000] (figure 10). C'est une forme physiologique de mort cellulaire, en opposition à un événement accidentel ou pathologique, et ce phénomène actif s'engage en réponse à des signaux spécifiques.

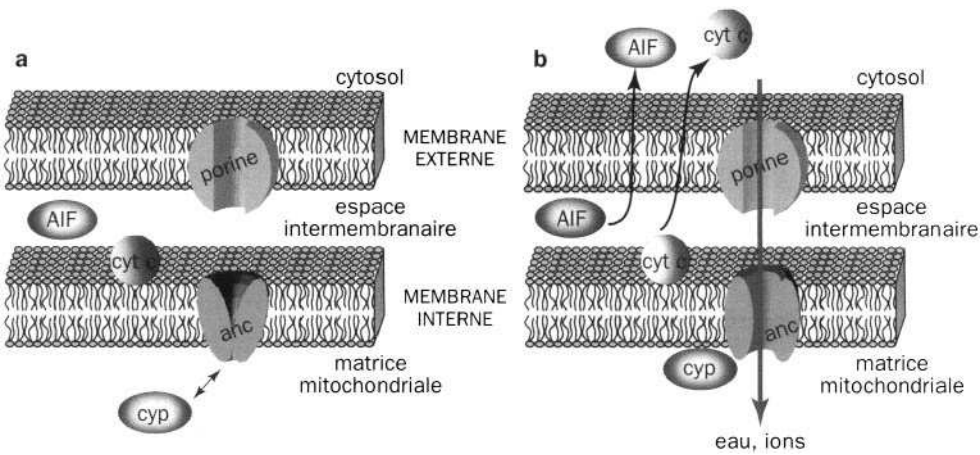


Figure 10 - Formation d'un pore de transition de perméabilité mitochondrial dans la phase effectrice qui précède l'exécution du programme de mort cellulaire

a - les composants du pore comprennent la porine localisée dans la membrane mitochondriale externe, le transporteur d'ADP/ATP (anc) localisé dans la membrane mitochondriale interne et capable d'interagir avec la cyclophiline mitochondriale (cyp). Le cytochrome c est associé à la face externe de la membrane interne et le facteur inducteur de l'apoptose (AIF) se situe dans l'espace intermembranaire.

b - dans la configuration ouverte du pore, de l'eau et des ions entrent dans la mitochondrie et induisent une dissipation du potentiel de membrane, un gonflement de la matrice. La rupture de la membrane externe provoque le relâchement dans le cytosol du **cytochrome c** et de AIF.

Il se caractérise par la coupure de l'ADN nucléaire, une diminution du volume cellulaire et la formation de protubérances (corps apoptotiques) qui sont phagocytées par les macrophages. Ainsi, les cellules mourant par apoptose n'entraînent pas de réaction inflammatoire comme lors de la nécrose.

La membrane externe mitochondriale isole dans l'espace intermembranaire des protéines potentiellement dangereuses par leurs fonctions apoptotiques, comme le cytochrome c, un composant de la chaîne respiratoire, associé à la face externe de la membrane interne et le facteur inducteur de l'**apoptose** (Apoptosis Inducing Factor, AIF) [LORENZO *et al.*, 1999].

2.4. LES LYSOSOMES : DES ORGANITES AU CONTENU ACIDE QUI CONTIENNENT UNE RICHE PANOPLIE D'ENZYMES DE DÉGRADATION

Les lysosomes (les vacuoles chez les plantes et les levures), limités par une seule membrane phospholipidique, sont des organites de taille et de forme très hétérogènes qui empaquettent des enzymes hydrolytiques et occupent une place privilégiée dans le catabolisme cellulaire. En moyenne, ils sont plus petits que les mitochondries et en nombre plus réduit (quelques centaines par cellule). Les hydrolases lysosomales dégradent le matériel extérieur ingéré par endocytose ou phagocytose mais attaquent aussi les matériaux de la cellule elle-même pour des fonctions de maintenance ou d'autophagie. Elles dégradent les polymères et les molécules complexes en leurs éléments constitutifs (acides aminés, sucres, acides gras...). Les grandes classes d'hydrolases lysosomales sont des protéases (cathepsines, collagénases...), des glycosidases (hexosaminidase, glucosidase, mannosidase...), des enzymes de dégradation de l'ADN et l'ARN (nucléotidases) et des phospholipides (phospholipases, lipases). Un certain nombre de maladies héréditaires sont dues à des déficiences lysosomales. Souvent, dans ces pathologies, le matériel non dégradé engorge le lysosome qui voit sa taille augmenter et, à terme, la cellule meurt.

L'intérieur du lysosome est maintenu à un pH acide voisin de 4,5 grâce à une H^+-ATPase membranaire qui fait passer les protons depuis le cytoplasme qui est à un pH proche de la neutralité (pH 7,5) vers l'intérieur du lysosome et crée ainsi un fort gradient de pH. Le pH intralysosomal acide est optimal pour l'activité enzymatique des hydrolases lysosomales qui sont très peu actives à pH neutre comme dans le cytoplasme ou les fluides extracellulaires. Ainsi, si un lysosome est détruit et relâche son contenu dans de tels espaces, la dégradation des composants sera limitée.

Les mécanismes de ciblage des hydrolases acides et des protéines membranaires lors de la biogenèse du lysosome sont complexes. Ainsi, lors de leur biosynthèse et dans une phase post-traductionnelle, les hydrolases sont modifiées dans l'appareil de GOLGI où elles acquièrent des résidus mannose-6-phosphate qui vont servir de signaux de tri, reconnus par des récepteurs membranaires spécifiques pour leur permettre de rejoindre sélectivement leur destination lysosomale.

3. CONCLUSION

Des connaissances importantes se sont accumulées au cours de ces 40 dernières années dans tous les secteurs de la biologie cellulaire. Cette période a illustré la richesse des démarches réductionnistes : par le fractionnement, l'isolement, l'étude des organites et de leurs composants moléculaires hors de leur environnement cellulaire, il a été possible de comprendre leur fonctionnement dans le détail. Cette approche s'est appuyée sur les extraordinaires progrès de la biologie moléculaire et structurale, ainsi que des nouvelles données de la génomique. Les organismes modèles eucaryotes sont de véritables pierres de Rosette pour aider à déchiffrer les données issus du séquençage du **génome** humain et comprendre le fonctionnement moléculaire de notre organisme. Avec les outils qui sont maintenant disponibles et les cadres conceptuels appropriés, les recherches sur les grands problèmes de biologie doivent se compléter par des études qui intègrent les acquis parcellaires dans le contexte du fonctionnement global et concerté de la cellule et de l'organisme.

RÉFÉRENCES

W.E. BOWERS - Christian de Duve and the discovery of lysosomes and peroxisomes. *Trends Cell Biol.* **8**, 330-333 (1998).

P.D. BOYER - The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749 (1997).

T.R. CECH - The ribosome is a ribozyme. *Science* **289**, 878-879 (2000).

P. COSSART, P. BOQUET, S. NORMARK & R. RAPPUOLI - *Cellular Microbiology*. ASM Press (2000).

W.F. DOOLITTLE - Uprooting the tree of life. *Sci. Am.* **282**, 90-95 (2000).

S.D. DYALL., C.M. KOEHLER, M.G. DELGADILLO-CORREA, P.J. BRADLEY, E. PLUMPER, D. LEUENBERGER, C.W. TURCK & P.J. JOHNSON - Presence of a member of the mitochondrial carrier family in hydrogenosomes : conservation of membrane-targeting pathways between hydrogenosomes and mitochondria. *Molecular & Cellular Biology* **20**, 2488-2497 (2000).

M.G. FARQUHAR & G.E. PALADE - The Golgi apparatus : 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* **8**, 2-10 (1998).

C. FIORE, V. TREZEGUET, A. LE SAUX, P. ROUX, C. SCHWIMMER, A.C. DIANOUX, F. NOEL, G.J. LAUQUIN, G. BRANDOLIN & P.V. VIGNAIS - The mitochondrial ADP/ATP carrier : structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie* **80**, 137-150 (1998).

J.H. HACKSTEIN, A. AKHMANOVA, B. BOXMA, H.R. HARHANGI & F.G. VONCKEN Hydrogenosomes : eukaryotic adaptations to anaerobic environments. *Trends Microbiol.* **7**, 441-447 (1999).

G. KROEMER & J.C. REED - Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* **6**, 513-519 (2000).

B.F. LANG, M.W. GRAY & G. BURGER - Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **33**, 351-397 (1999).

H.K. LORENZO, S.A. SUSIN, J. PENNINGER & G. KROEMER - Apoptosis inducing factor (AIF) : a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Diff.* **6**, 516-524 (1999).

A. LWOFF - *L'Ordre biologique*. Robert Laffont, Paris (1969).

J.A. MC NEW, F. PARLATI, R. FUKUDA, R.J. JOHNSTON, K. PAZ, F. PAUMET, T.H. SOLLNER & J.E. ROTHMAN - Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* **407**, 153-159 (2000).

P. MITCHELL - Compartmentation and communication in living systems. Ligand conduction : a general catalytic principle in chemical, osmotic and chemiosmotic reaction systems. *Eur. J. Biochem.* **95**, 1-20 (1979).

P. MITCHELL & J. MOYLE - Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* **213**, 137-139 (1967).

A. PRALLE, P. KELLER, E.L. FLORIN, K. SIMONS & J.K. HORBER - Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. *J. Cell Biol.* **148**, 997-1008 (2000).

M. SARASTE - Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* **283**, 1488-1493 (1999).

S.J. SINGER & G.L. NICOLSON - The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731 (1972).

D. STOCK, A.G. LESLIE & J.E. WALKER - Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705 (1999).

J.A. THOMSON, J. ITSKOVITZ-ELDOR, S.S. SHAPIRO, M.A. WAKNITZ, J.J. SWIERGIEL, V.S. MARSHALL & J.M. JONES - Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147 (1998).

R. YASUDA, H. NOJI, K. KINOSITA Jr & M. YOSHIDA - F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* **93**, 1117-1124 (1998).

POUR EN SAVOIR PLUS

H. LODISH, A. BERK, L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA, D. BALTIMORE & J. DARNELL *Molecular Cell Biology*. 4th ed., W.H. Freeman & Company (2000).

B. ALBERTS, A. JOHNSON, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS & P. WALTER *Molecular Biology of the Cell*. 4th ed., Garland Publishing Inc (2002), lié à la base bibliographique d'accès libre *PubMed* du National Institute of Health : *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*. Autre site intéressant : *http://www.ergito.com/*.

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

Chapitre II

ELÉMENTS DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE : LE MATÉRIEL HÉRÉDITAIRE

Olivier COHEN - Jacques DEMONGEOT

1. BRÈVE HISTOIRE DE LA GÉNÉTIQUE DE MENDEL À MONOD

En 1745, BUFFON écrivit, en son château de Montbard, au Nord de Dijon, la première phrase du chapitre III du tome 2 de son *Histoire Naturelle*, qui est une des phrases fondatrices de la biologie moderne (figure 1).

168 ŒUVRES COMPLÈTES DE BUFFON.

CHAPITRE III

DE LA NUTRITION ET DU DÉVELOPPEMENT

Le corps d'un animal est une espèce de moule intérieur, dans lequel la matière qui sert à son accroissement se modèle et s'assimile au total; de manière que, sans qu'il arrive aucun changement à l'ordre et à la proportion des parties, il en résulte cependant une augmentation dans chaque partie prise séparément, et c'est cette augmentation de volume qu'on appelle développement, parce qu'on a cru en rendre raison en disant que l'animal étant formé en petit comme il l'est en grand, il n'était pas difficile de concevoir que ses parties se développaient à mesure qu'une matière accessoire venait augmenter proportionnellement chacune de ces parties (*).

Figure 1 - Texte de BUFFON issu de l'*Histoire Naturelle* (tome 2, 1745)

Cette phrase de BUFFON concernant l'existence d'un « moule intérieur » chez tout animal peut être considérée, 120 ans avant Claude BERNARD, comme posant déjà le principe de l'**homéostasie** du milieu intérieur, ce que les mathématiciens de la dynamique qualitative traduisent maintenant par l'existence d'**attracteurs** dans les organismes doués d'un métabolisme régulé de manière **endogène**.

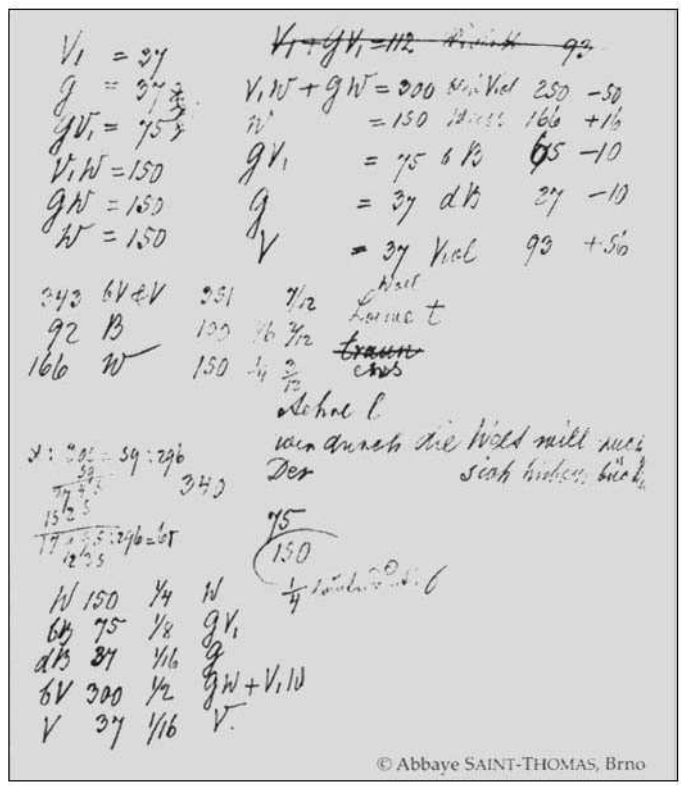
Un demi-siècle après BUFFON, LAMARCK, dans son célèbre *Discours d'ouverture de l'Académie Royale des Sciences* du 21 floréal an huit de la République (10 mai 1800), pose le principe d'une évolution progressive, fondée sur l'adaptation, au cours de laquelle *la fonction crée l'organe et son non-usage l'anéantit.* Cette affirmation précise la manière dont la notion de moule intérieur d'un organisme vivant (constitué de l'ensemble des fonctions de sauvegarde de l'homéostasie de cet organisme) a évolué dans sa relation fonctionnelle avec l'environnement [LAMARCK, 1802].

© Marcel Dekker Inc.

J.B. DE LAMARCK
(1744 - 1829)

© Bibliothèque centrale MNHN Paris 2003

G. MENDEL
(1822 - 1884)



© Abbaye SAINT-THOMAS, Brno

Figure 2 - Notes manuscrites de Gregor MENDEL illustrant les calculs qu'il avait effectués pour ré-examiner les données issues des expériences sur l'hybridation des plantes
(voir http//www.mendel-museum.org)

MENDEL, 65 ans plus tard [MENDEL, 1865], c'est-à-dire au moment même où Claude BERNARD concevait le principe de régulation homéostatique [BERNARD, 1865], travaillant sur la transmission de caractères morphologiques chez le pois de

senteur, sans connaître la notion de **chromosome** (le mot fut inventé seulement en 1888 par WALDEYER), définit néanmoins parfaitement les lois de la **ségrégation** du matériel génétique, entre les deux **gamètes** issus d'une **méiose** chez l'un des deux parents d'une génération de pois de senteur. Travaillant dans un petit jardin (200 m^2 environ) de son monastère de Brno (figure 2), il parvint à décrypter la loi de ségrégation d'un caractère morphologique mono-génique (voir encadré), comme le caractère ridé ou lisse du pois de senteur, plante dont l'**auto-fécondation** permet de contrôler expérimentalement les générations successives.

La loi de ségrégation de MENDEL

On peut expliquer simplement la loi de ségrégation d'un caractère mono-génique de la manière suivante :

Deux parents (en haut, le père et, en bas, la mère) ont un **phénotype** (c'est-à-dire une apparence) « yeux marrons », tout en ayant un **allèle** récessif « yeux bleus » et un allèle dominant (c'est-à-dire imposant son phénotype au récessif) « yeux marrons ». Leurs enfants auront alors 1 chance sur 2 d'être comme leurs parents (« yeux marrons » avec 2 allèles différents), et 1 chance sur 2 d'avoir deux fois le même allèle, donnant soit « yeux marrons » soit « yeux bleus » (1 chance sur 4).

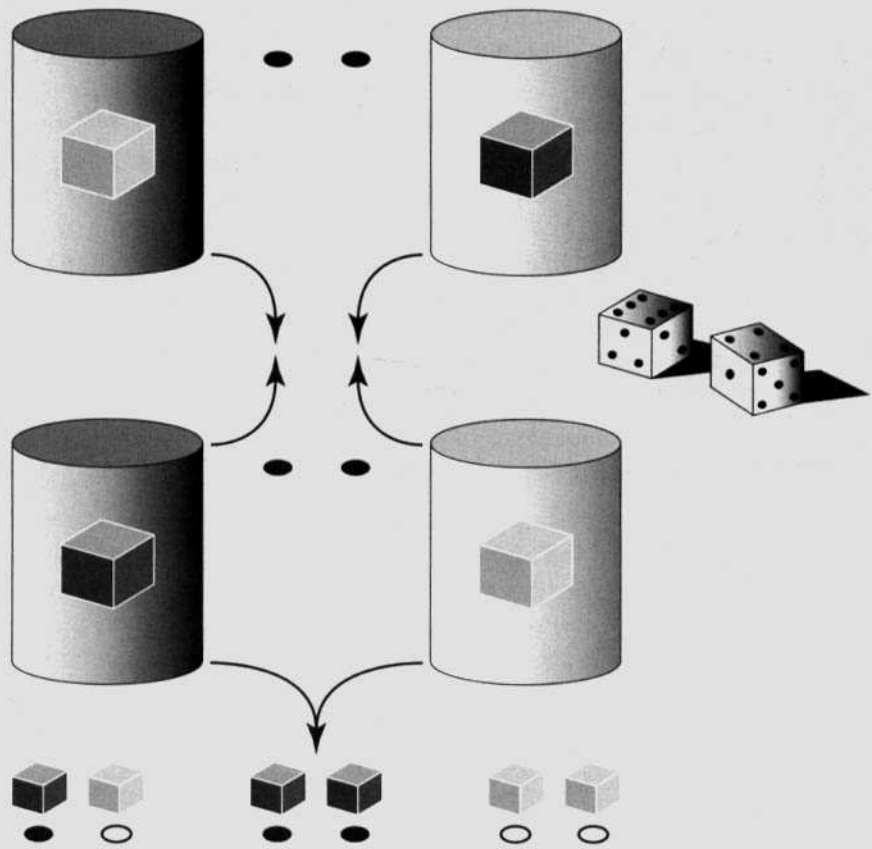


Figure 3 - La loi de ségrégation de MENDEL

Actuellement, les principes de base de la ségrégation méiotique mendélienne ne sont pas remis en cause. Les recherches actuelles sont centrées sur les mécanismes biochimiques permettant les échanges de matériel génétique [enjambement ou **crossing-over**, puis transport sur le fuseau achromatique (voir chapitre 3, § 1)], dynamique complexe qui exige l'existence d'un équilibre transitoire sous tension des chromosomes en cours d'échange [FARAUT & DEMONGEOT, 2000] et sur les anomalies de cette ségrégation (comme, par exemple, les **translocations réciproques** [COHEN *et al.*, 1994, 1996, 2001 et FARAUT *et al.*, 1999]). Ces anomalies ont été observées pour la première fois systématiquement par H. DE VRIES [DE VRIES, 1901] chez une plante, l'herbe aux ânes ou onagre, déjà étudiée par LAMARCK, et dont le nom scientifique est *Oenothera lamarckiana* (voir figure 17). DE VRIES a qualifié à tort ces translocations de *mutations* en 1902, dans son ouvrage *Die Mutations Theorie*, mais l'existence de mutations réelles, dues à des agents exogènes (ionisants par exemple), est devenue ensuite rapidement le support physique de la théorie de l'évolution émise par DARWIN environ 40 ans plus tôt [DARWIN, 1859]. A la suite de l'expédition du Beagle, en particulier aux îles Galapagos, dans le massif de la Campana, dans la vallée de l'Aconcagua et en Terre de Feu, l'observation de l'extraordinaire diversité des espèces et des conditions environnementales lui permit de postuler l'hypothèse de la sélection de l'espèce « variante » la mieux adaptée à l'environnement. Cette adaptation régit la **phylogenèse**. Elle a pour conséquence une **ontogenèse** optimale sous des contraintes **exogènes** données. C.H. WADDINGTON l'a traduite en 1966 en disant que l'embryon décrivait une trajectoire idéale dans le **paysage morphogénétique** (appelé **chréode**, figure 4), défini par les concentrations des constituants de l'organisme en cours de formation [WADDINGTON, 1966]. Cette trajectoire exprime les lois physico-chimiques classiques (diffusion et réaction essentiellement, voir annexe IV), mais aussi bien sûr les lois de la régulation génétique qui peuvent faire bifurquer les trajectoires physico-chimiques, dites **épigénétiques**, vers des comportements phénotypiques multiples. Par exemple, des mécanismes de double répression ne sont pas rares dans la régulation des réseaux génétiques décrits ci-après [1]. La technique des biopuces (voir § 9) permet actuellement de détecter les gènes dont la co-expression est responsable de telles bifurcations.

Une théorie ancienne, due à HAECKEL [HAECKEL, 1874] et revisitée récemment [RICHARDSON *et al.*, 1997], tente de relier l'ontogénèse à la phylogénèse, en disant que la première récapitule (en partie seulement) la seconde, ce qui montre la rigueur des contraintes qu'exprime la nécessité du vivant selon MONOD : même si une solution morphologique a été trouvée au hasard, elle s'est inscrite durablement dans le patrimoine génétique si elle a optimisé une certaine fonction d'adaptation (*fitness*) darwinienne.

1. Par exemple, vers le sexe féminin ou le masculin, par répression, par un gène du chromosome Y, du gène du chromosome X qui réprime la morphogénèse des organes sexuels mâles.

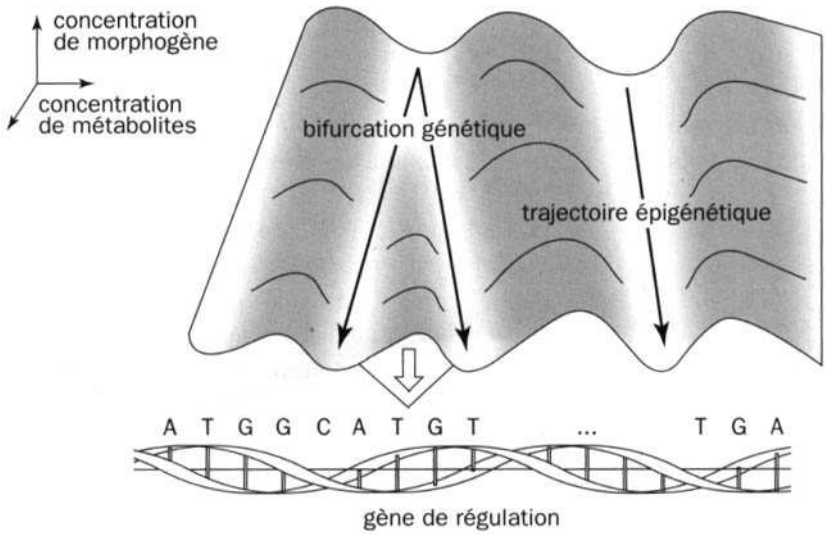


Figure 4 - Action d'un gène dans une chréode de WADDINGTON
Représenté au-dessous de la surface de concentration d'un morphogène, le gène de régulation modifie les paramètres structuraux (comme la vitesse maximale d'une enzyme) du paysage morphogénétique gouvernant la trajectoire épigénétique responsable du phénotype.

La ségrégation permet en effet de transmettre, non seulement les gènes parentaux, mais également les réseaux de régulation (par leurs produits d'expression, les **protéines**) qui leur sont associés : lorsque ces réseaux correspondent à une fonction bien précise (par exemple le métabolisme du lactose, figure 5), ils rassemblent plusieurs groupes de gènes contigus transcrits en une seule molécule d'ARNm, auxquels F. JACOB et J. MONOD ont donné, en 1960, le nom d'**opérons** [JACOB *et al.*, 1960]. Cette dénomination apparaît environ cent ans après la découverte de MENDEL. MONOD, à la suite d'un séjour dans le laboratoire de MORGAN, avait hérité de la connaissance de la ségrégation mendélienne transposée dans le monde animal (celui de la drosophile) par T.H. MORGAN [MORGAN *et al.*, 1923] et avait également découvert aux Etats-Unis le dogme fondamental de la génétique « un gène = une enzyme », inventé par BEADLE et TATUM [BEADLE & TATUM, 1941]. Celui-ci a été depuis remplacé par l'adage « un gène = une famille de protéines dont la séquence primaire d'acides aminés [2] et la conformation 3D dépendent des mécanismes de régulation transcriptionnelle et des conditions de maturation ».

Avant d'aborder les mécanismes fonctionnels complexes liés à l'expression des gènes, nous allons donner quelques précisions sur l'anatomie du **génome**, en particulier sur la principale molécule qui en est le support, l'acide désoxyribonucléique ou **ADN**. Sa structure fut découverte en 1953 par J.D. WATSON et F. CRICK [WATSON & CRICK, 1953], mettant ainsi, avec MONOD et JACOB, un point final au siècle le plus florissant de l'histoire de la génétique, que d'aucuns ont appelé « le matin des généticiens ».

2. Voir le paragraphe 2.1 plus loin.

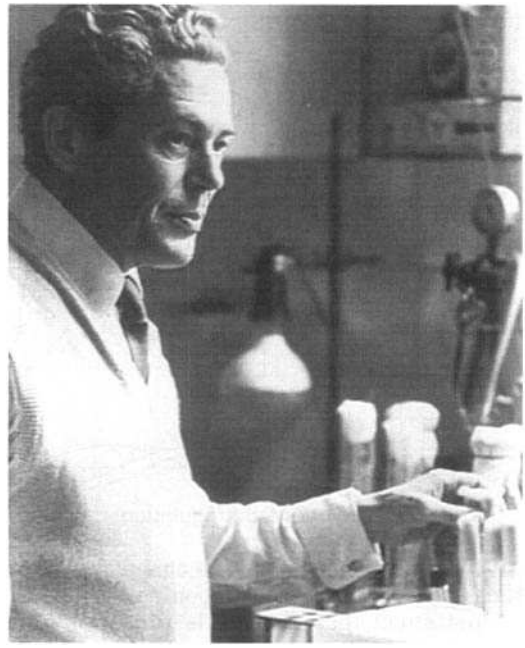


Figure 5 - Jacques MONOD dans son laboratoire à l'Institut PASTEUR vers 1970/1975
(© Institut PASTEUR)

Nous présenterons, dans la suite, des informations générales sur le matériel génétique et les mécanismes de son expression. Nous indiquons au lecteur en fin de chapitre un ensemble d'ouvrages qui proposent une description plus précise et plus complète de la génétique anatomique et fonctionnelle, en particulier pour la cellule procaryote et la cellule eucaryote.

2. *STRUCTURE ET DYNAMIQUE DE L'ADN*

2.1. STRUCTURE DE BASE

L'**ADN** (Acide **D**ésoxyribo **N**ucléique) a une forme de double hélice droite. La figure 6 indique la première représentation simplifiée de la molécule d'ADN donnée par J.D. WATSON et F. CRICK dans leur article *princeps* publié dans *Nature* en 1953 [WATSON & CRICK, 1953]. Chaque hélice est une longue chaîne formée par l'enchaînement de **nucléotides**, reliés entre eux par des **liaisons 5' → 3'** phosphodiester (figure 7). Chaque nucléotide unit, par une **liaison N-glycosidique**, un désoxyribose 5'phosphate à une **base** purique (adénine [A], guanine [G]) ou pyrimidique (thymine [T], cytosine [C]).

Les deux chaînes s'associent entre elles par complémentarité des bases : A-T et C-G *via* des ponts hydrogène : deux entre A et T et trois entre C et G.

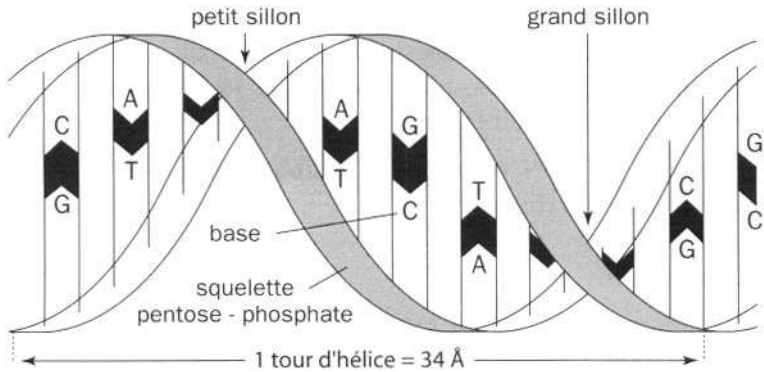


Figure 6 - La double hélice (d'après le dessin original de F. CRICK et J.D. WATSON)

Les bases sont des molécules planes. Leurs plans sont parallèles entre eux et perpendiculaires à l'axe de l'hélice. Le pas de l'hélice est de 34 Å. Le squelette des sucres (squelette pentose-phosphate) est constitué de deux chaînes hélicoïdales anti-parallèles. Les arêtes créées par l'enchaînement des groupements phosphates définissent deux sillons : le petit et le grand sillon. Les bases ne sont accessibles aux protéines qu'au niveau du grand sillon, lieu d'interaction protéines-ADN.

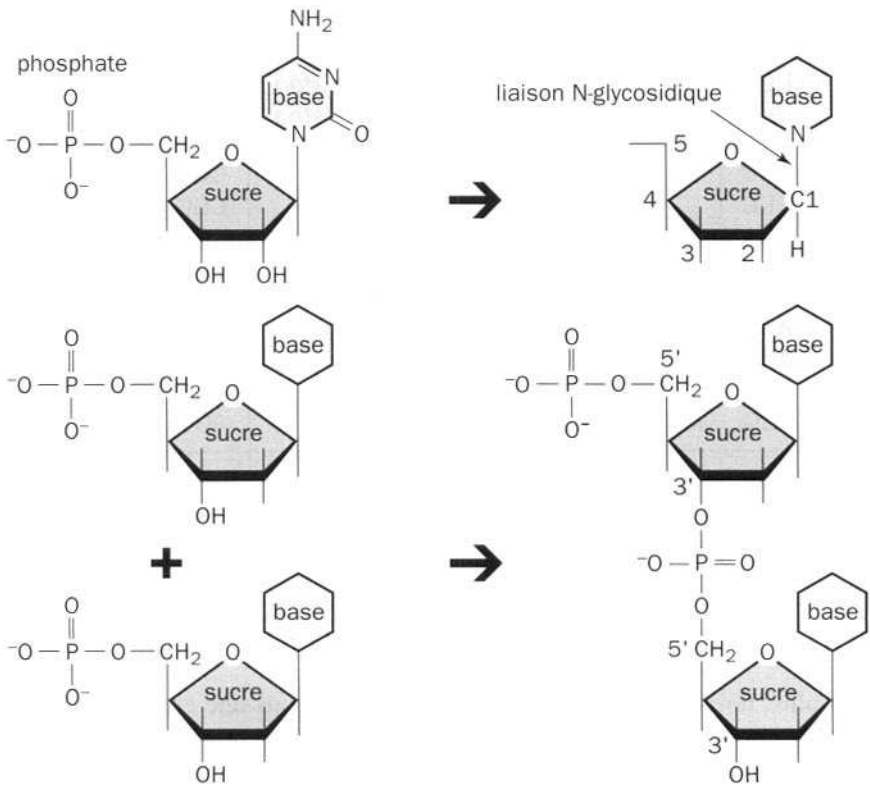


Figure 7 - Nucléotides, liaison N-glycosidique et liaison 5'-3'
(d'après ALBERTS *et al.*, 1998, © Routledge/Taylor & Francis Books, Inc.)

Les deux brins sont composés de séquences de bases complémentaires. La complémentarité des bases explique la cohésion de la molécule. Les deux chaînes de **nucléotides** sont anti-parallèles, c'est-à-dire que les deux directions de leurs liaisons 5'-3' sont opposées (voir figure 6).

Il existe trois formes de l'ADN, dites **formes tautomériques** :
- ✓ B : type décrit ci-dessus (figure 6),
- ✓ A : forme déshydratée,
- ✓ Z : hélice gauche.

L'unité élémentaire d'information est le triplet de nucléotides ou **codon**. On appelle **code génétique** (figure 8) l'ensemble des relations faisant correspondre les différents triplets avec les différents **acides aminés** (AA). Ce transcodage s'appelle **traduction**. Le code génétique est :
- ✓ non-ambigu : un triplet correspond à un seul AA,
- ✓ non-chevauchant : les triplets sont lus successivement,
- ✓ dégénéré : plusieurs triplets (de 1 à 6) peuvent correspondre au même AA,
- ✓ sans ponctuation interne : il n'y a que des triplets codant pour l'initiation et la terminaison d'une « phrase » protéique, faite de la succession des triplets correspondant à la succession des AA de la protéine.

UUU, UUC : *Phe* UUA, UUG : *Leu*	UCU, UCC, UCA, UCG : *Ser*	UAU, UAC : *Tyr* UAA : *stop* UAG : *stop*	UGU, UGC : *Cys* UGA : *stop* UGG : *Trp*
CUU, CUC, CUA, CUG : *Leu*	CCU, CCC, CCA, CCG : *Pro*	CAU, CAC : *His* CAA, CAG : *Gln*	CGU, CGC, CGA, CGG : *Arg*
AUU, AUC, AUA : *Ile* AUG : *Met*	ACU, ACC, ACA, ACG : *Thr*	AAU, AAC : *Asn* AAA, AAG : *Lys*	AGU, AGC : *Ser* AGA, AGG : *Arg*
GUU, GUC, GUA, GUG : *Val*	GCU, GCC, GCA, GCG : *Ala*	GAU, GAC : *Asp* GAA, GAG : *Glu*	GGU, GGC, GGA, GGG : *Gly*

Figure 8 - Le code génétique

Il est, de plus, universel, c'est-à-dire qu'il ne varie pas d'une espèce à l'autre, et, à l'intérieur d'une même espèce, d'un type cellulaire à l'autre. Sa **dégénérescence** est non-équilibrée (certains AA sont représentés par 1 codon et d'autres par 6) et certains codons ne codent pas pour des AA, mais pour des signaux d'initiation (AUG) ou de terminaison (UAA, UAG, UGA) des protéines.

L'évolution possible du code génétique à partir d'un code archétypal plus ancien est discutée dans l'annexe II-1. L'optimalité du code actuel, en terme de **code cyclique** [3] et de code minimisant les erreurs de transcription, a été démontrée et pourrait être la conséquence de cette évolution qui aurait privilégié un code ayant des capacités auto-correctrices (c'est-à-dire capable d'éliminer l'effet de **mutations ponctuelles**, du fait d'une répartition adéquate des codons synonymes).

2.2. DÉNATURATION-RÉASSOCIATION DE L'ADN

La dénaturation, prouvée par R. THOMAS il y a environ 50 ans, est la séparation des deux brins d'ADN. Elle est totalement réversible : le processus inverse est la réassociation (ou renaturation, ou **hybridation**). La vitesse de réassociation est estimée par le **COT** (Concentration-Temps), plus exactement par le COT50, qui est le temps correspondant à 50% de réassociation. Le COT permet de distinguer différentes classes d'ADN, en fonction de leur degré de répétition.

2.3. DYNAMIQUE DE L'ADN

La structure classique de l'ADN peut se modifier, donnant lieu à divers changements de **conformation** de la molécule. Les changements de forme tautomériques vont, par exemple, de A en Z, lors d'une modification du degré de méthylation des cytosines.

Une séquence d'ADN (et donc l'expression génique) peut être également modifiée par des séquences mobiles, comme les séquences d'insertion ou **transposons** (chez les procaryotes), qui sont capables de réplication, de telle sorte que la copie s'insère dans une autre partie du **génome**.

L'amplification d'une séquence peut aussi se produire par sa multiplication sur le même site.

3. ORGANISATION DE L'ADN : CHROMATINE ET CHROMOSOMES

Dans le noyau de la cellule eucaryote, l'ADN, lié à des protéines nucléaires, présente une structure particulière complexe, constituant le matériel génétique fonctionnel, appelé **chromatine**. Celle-ci représente l'organisation normale de l'ADN nucléaire durant le **cycle cellulaire**, en dehors de la **mitose** ou de la **méiose**, phases ultimes du cycle pendant lesquelles l'ADN est condensé sous forme de chromosomes.

---

3. C'est-à-dire fondé sur l'existence d'une séquence lue sur ses trois premières bases obtenues après des permutations circulaires. Les mots de longueur k issus d'un code cyclique de longueur $n > k$ sont générés par l'ensemble des k premières lettres des permutations circulaires du code.

3.1. LA STRUCTURE DE BASE, FIBRE DE 100 Å DE DIAMÈTRE

Cette fibre est constituée par l'association de l'ADN à des protéines, appelées **histones**, riches en AA basiques, nommées H_{2A}, H_{2B}, H_3 et H_4. Elle est organisée en structures globulaires, appelées **nucléosomes**. Les nucléosomes sont reliés entre eux par de l'ADN inter-nucléosomique (linker) et de l'histone H_1 (figure 9).

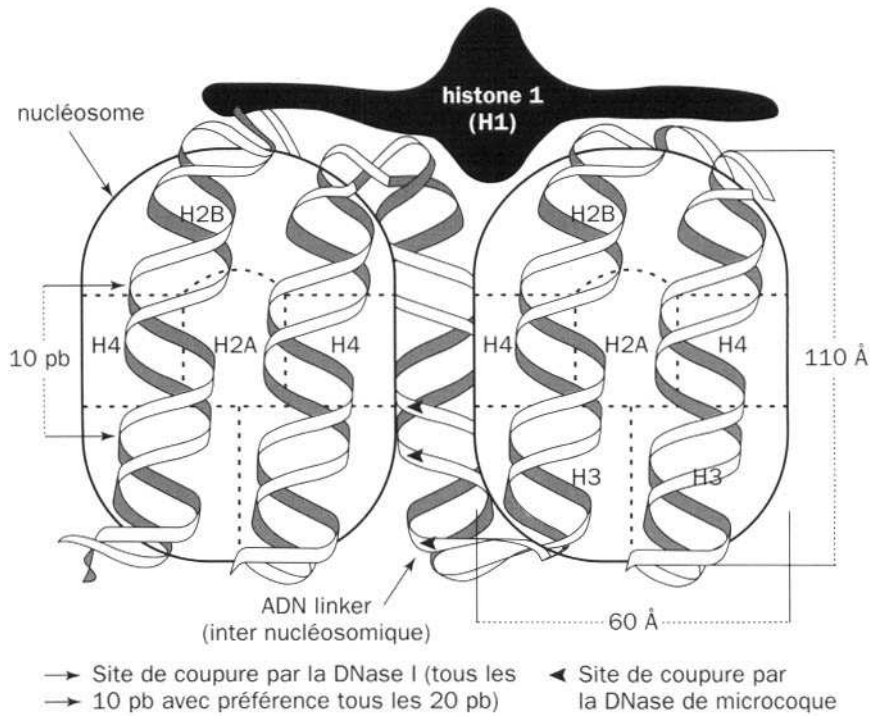


Figure 9 - Organisation en nucléosomes de la fibre de 100 Å
(d'après KAPLAN & DELPECH, 1993, droits réservés)

3.2. LA SUPERSTRUCTURE DE BASE, FIBRE DE 300 Å DE DIAMÈTRE

La fibre de 100 Å se bobine en hélice pour former un solénoïde de 300 Å de diamètre, dont le pas est constitué de 6 nucléosomes. Cette fibre est hautement stabilisée par l'histone H_1, qui joue un rôle d'agrafe, assurant la rigidité de la superstructure hélicoïdale.

3.3. ORGANISATION EN CHROMOSOMES

Lors de la mitose, le **chromosome** humain constitue un fragment du matériel génétique total contenu dans le noyau d'une cellule humaine, identifié en microscopie optique par WALDEYER en 1888. Il a une structure hétérogène et cette

hétérogénéité morphologique traduit une hétérogénéité fonctionnelle. D'autres niveaux de structuration hiérarchisés, moins bien compris, concourent à la condensation chromatinienne.

3.3.1. Morphologie commune

Chaque chromosome est formé de deux **chromatides**, réunies en une région centrale, le **centromère**, chaque chromatide se terminant par une structure particulière, appelée **télomère**. Celle-ci constitue la partie du chromosome la plus sensible au processus de vieillissement, ce qui provoque des erreurs de duplication après un nombre de mitoses dépendant du tissu (limite de HAYFLICK). La place du centromère permet de distinguer deux bras, l'un court (de longueur p) et l'autre long (de longueur q). La localisation des gènes sur les bras est repérée soit en distance physique en comptant le nombre de bases (mesurée en **kilo-base**), soit en distance fonctionnelle en comptant le nombre de sites de réarrangement par **crossing-over** (mesurée en **centimorgan**), cela à partir du centromère (figure 10).

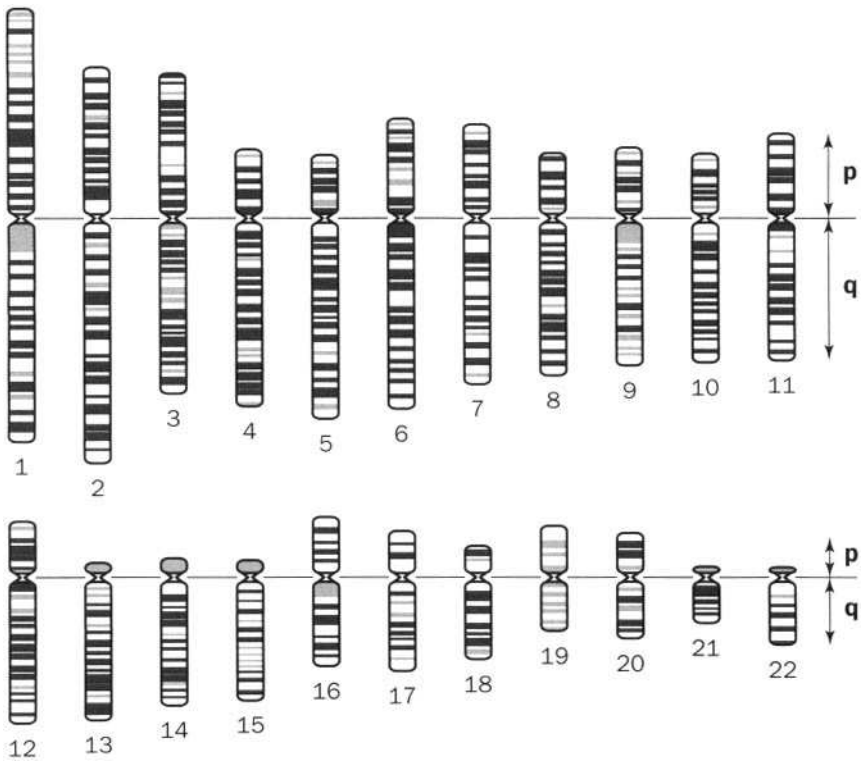


Figure 10 - Les chromosomes humains et leurs bandes, avec leurs bras courts (p) et longs (q) séparés par les centromères
(d'après U. FRANKE, *Cytogenet. Cell Genet.* **31**, 24-32 (1981) S. Karger AG, Basel)

On appelle indice centromérique le rapport i = p / q. Il permet de distinguer des morphologies différentes des chromosomes, appelés métacentriques ($i > 1/2$), submétacentriques ($i \sim 1/2$) et acrocentriques ($i < 1/2$).

3.3.2. Aspects en microscopie optique

Aspects généraux

Les chromosomes sont de petits bâtonnets qui, après avoir été soumis à des techniques de dénaturation des protéines, puis de coloration, présentent des bandes (figure 10). Il existe différentes méthodes de dénaturation faisant apparaître différentes bandes, ce qui rend compte de l'hétérogénéité de leur contenu. La nomenclature internationale distingue :

- ✓ les bandes G, en noir sur la figure 10, car sensibles à la coloration Giemsa,
- ✓ les bandes R, en blanc, en particulier au niveau des **télomères**,
- ✓ les bandes C, en gris, qui visualisent l'**hétérochromatine** constitutive.

Le nombre de bandes révélées peut varier largement selon le chromosome (400 à 2 000 bandes) et définit le niveau de résolution de l'examen chromosomique.

Signification des bandes

- ✓ ***Les bandes G*** sont riches en AT, en **introns** et en séquences répétitives. Elles sont le siège d'une réplication tardive.
- ✓ ***Les bandes R*** sont riches en CG et en gènes et sont pauvres en séquences répétitives. Elles sont le siège d'une réplication précoce.
- ✓ ***Les bandes C*** sont constituées de chromatine très condensée et sont visibles surtout dans la première phase G1 du **cycle cellulaire** (voir chapitre 3, § 1).

3.3.3. Aspects en microscopie électronique

En microscopie électronique ultra-structurelle, on peut observer le squelette du chromosome sous la forme d'un réseau protéique. On peut également observer son organisation en **nucléosomes** et son empaquetage par les **histones** H_1. Une déplétion en histones fait apparaître des boucles d'ADN.

3.4. DIMENSION DU GÉNOME HAPLOÏDE

Le **génome haploïde** humain pèse environ 3 pg et mesure environ 1,2 m, soit environ 3,5 **Gbases** (5 bases /1,7 nm, soit 10 bases par tour d'hélice primaire d'ADN), correspondant à une quantité d'information de 1 Gigaoctet[4], c'est-à-dire environ la même que celle contenue dans l'*Encyclopaedia Britannica*. Ces dimensions montrent le degré avec lequel l'ADN est compacté dans un noyau cellulaire de quelques micromètres cube (μ^3). Il y a une corrélation entre la quantité d'ADN d'une espèce et sa complexité : en particulier, les organismes pluricellulaires ont un ADN plus important que les uni-cellulaires et leur nombre de tissus est corrélé positivement avec la taille de leur ADN.

4. Chaque base apporte 2 bits d'information, puisque la probabilité de son occurrence est de 1/4 environ.

4. DIFFÉRENTES SORTES D'ADN

L'ensemble des zones d'ADN codant des protéines ne représente qu'une toute petite fraction (10%, correspondant à 350 Mbases, soit 35 000 gènes codant des protéines, de 10 000 bases environ chacun en moyenne) de la totalité de l'ADN. La majorité de l'ADN (90%) est de type « répété », c'est-à-dire constitué de séquences en général courtes (une dizaine de bases) répétées un grand nombre de fois.

4.1. L'ADN « NOBLE » : LES GÈNES

4.1.1. Définition

Le gène est l'*unité d'hérédité*.

Chaque gène est une séquence d'acide nucléique qui porte l'information nécessaire à la construction d'un **polypeptide** (ou protéine) ou d'une molécule d'ARN fonctionnelle comme l'ARN de transfert (voir § 5.3). Un gène est une entité stable ; un changement dans sa séquence s'appelle une mutation : elle peut être ponctuelle ou affecter plusieurs bases.

Plusieurs concepts de gène se sont succédés historiquement :

- ✓ La conception classique consiste à associer gène et ***unité de ségrégation*** (ou ***de transmission***) : le gène ne peut être décelé que par l'effet qu'il exerce. Les caractères phénotypiques distinctifs correspondent à un même gène qui existe sous différentes formes ou allèles. Cependant, une unité de ségrégation peut correspondre à plusieurs gènes. Ainsi, un **haplotype** correspond à une combinaison d'allèles situés au niveau de **loci** (c'est-à-dire de localisations sur le chromosome) proches, et transmis ensemble.
- ✓ Le gène est une ***unité de transcription***. Ce concept est fondé sur la constatation que de nombreux gènes ont une taille bien plus importante que celle de leur **ARN messager** (ARNm) . Ce terme, inventé par MONOD et JACOB, désigne une molécule d'**A**cide **R**ibo **N**ucléique (ARN) ayant la même séquence que la partie codante du gène, la base T étant remplacée par la base U (uracile)[5]. Ce concept d'unité de transcription prend en compte, dès 1976, la nature morcelée des gènes (voir § 4.12).

Le gène est un *message*.

Ce message est constitué de **séquences codantes** ou **exons**, séparées par des séquences non-codantes ou **introns**, et balisées par des signaux. Les introns sont des séquences interposées, supprimées dans la transcription, comme nous le verrons au paragraphe 5.2.3[6]. Un gène commence et finit toujours par un exon,

5. Une description plus complète de l'ARNm est proposée plus loin dans le paragraphe 5.1.

6. Nous verrons également que des exons peuvent être supprimés (§ 6.2.5).

l'initial et le terminal, correspondant respectivement aux extrémités 5' et 3' de l'ARNm. Le nombre d'introns entre les deux exons extrêmes est variable. Seuls les eucaryotes ont des **séquences codantes** interrompues, mais tous les gènes eucaryotes ne sont pas en mosaïque. Il n'est pas possible de trouver une relation entre la taille du gène et celle de son ARNm.

D'importantes caractéristiques sont communes à tous les gènes morcelés :
- ✓ l'ordre dans lequel apparaissent les différentes parties du gène morcelé est le même dans le **génome** que dans l'ARNm mature. Les gènes sont donc morcelés, mais pas dispersés,
- ✓ les introns n'ont pas de fonction codante,
- ✓ un gène morcelé a la même structure dans tous les tissus, qu'il soit exprimé ou non dans ce tissu. Par conséquent, la présence d'un intron est une caractéristique invariable d'un gène.

Il n'y a pas de rapport direct entre la taille d'une protéine et celle de son gène.

4.1.2. Structure d'un gène

Il n'existe pas de structure définie absolue, mais la description que nous allons voir à présent est la plus fréquente :

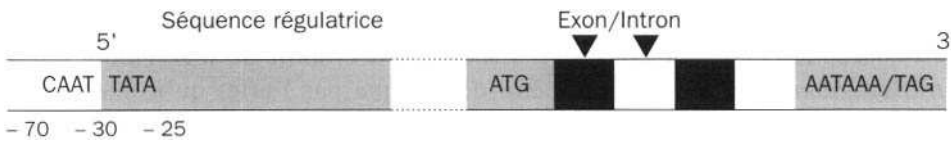


Figure 11 - Schéma d'un gène codant pour une protéine

Un gène est constitué d'un promoteur et d'autres éléments de contrôle situés en amont du gène, puis du gène lui-même et, enfin, d'une terminaison.

La région amont (en 5') est une région de régulation.
Non-transcrite, elle est nécessaire pour que la transcription puisse s'effectuer normalement. Elle peut comporter différentes séquences régulatrices : vers – 100 bases par rapport au site d'initiation de la transcription commence la région promotrice. Un **promoteur** peut être défini comme une séquence invariable d'ADN reconnue par l'**ARN polymérase**. De – 70 à – 80, se trouve très souvent une séquence CAAT, où se fixent des facteurs protéiques de régulation de la transcription, comme nous le verrons plus loin. De – 25 à – 30, on retrouve le plus souvent la séquence TATA, appelée **TATA box** (figure 11). C'est à ce niveau que se fixe l'ARN polymérase. La présence d'une TATA box n'est pas indispensable à la transcription. En effet, une délétion ou une mutation entraîne une diminution de la transcription (mais pas son arrêt), ainsi qu'une perte de la fidélité du point exact d'initiation [LEWIN, 2000].

La partie transcrite est constituée :

- ✓ ***du site d'initiation de la transcription*** - le site d'initiation est défini comme étant la paire de bases de l'ADN correspondant au premier **nucléotide** incorporé dans l'ARNm. La base correspondant à ce site est le plus souvent une **purine**. Suit une partie non-codante de longueur variable, jusqu'à la séquence ATG (codon méthionine), site d'initiation de la traduction,
- ✓ ***d'une alternance exons-introns*** - comme nous l'avons déjà vu, le gène proprement dit, chez un eucaryote, est composé d'une alternance d'exons et d'introns. Les introns sont limités par des **séquences** dites **consensus**, la séquence GT et la séquence AG respectivement en 5' et en 3' de l'intron,
- ✓ ***d'un signal d'arrêt*** - le signal pour l'arrêt de la traduction est donné par l'un des **codons stop** TAA, TGA, TAG. Enfin, 10 à 20 bases avant la fin du dernier exon, est retrouvée une séquence AATAAA, improprement appelée séquence de **polyadénylation**. Il s'agit en fait d'une séquence de reconnaissance pour la coupure du transcrit primaire.

Le gène se termine par une région 3' adjacente très mal connue (composée de séquences régulatrices ?).

4.1.3. Classement des gènes

On peut classer les gènes codant pour les protéines selon le nombre de leurs copies.

Les gènes uniques ou quasi-uniques

Il s'agit de la très grande majorité des gènes. Leur structure correspond à celle qui vient d'être décrite. La séquence CAAT est souvent absente. Certains gènes ont été dupliqués au cours de l'évolution. Les deux copies peuvent être totalement interchangeables. Dans d'autres cas, les deux copies ont un peu divergé, donnant deux protéines aux propriétés proches, mais différentes. L'expression de l'une ou de l'autre de ces copies peut être fonction du développement ou de l'organe.

Les familles de gènes

Il s'agit ici le plus souvent d'une extension du phénomène de duplication-divergence. Il en résulte toute une série de gènes codant pour des protéines proches. Parmi les exemples connus, citons la famille des gènes myosine. Une des explications avancées pour l'existence de telles familles chez un organisme doué d'un système immunitaire est la sélection d'anti-anti-corps. Leur ARNm est fabriqué par une cellule immuno-compétente pouvant donner la séquence correspondante d'ADN par l'effet de la **transcriptase inverse** si elle contient un **rétrovirus**. Ses propriétés catalytiques peuvent être meilleures que celles de l'enzyme-antigène initial ayant donné l'anti-anti-corps par deux mécanismes de réaction immunitaire consécutifs.

Les superfamilles

Elles résultent d'un phénomène analogue, mais qui s'est produit beaucoup plus tôt dans l'évolution. La divergence est telle qu'il est difficile de mettre en évidence les relations entre les gènes. Un exemple est la superfamille des gènes de l'immunité.

4.1.4. Une catégorie à part : les gènes domestiques

Certains gènes ne s'expriment que dans certains tissus, c'est la base de la **différenciation cellulaire**. D'autres, au contraire, codent pour des protéines ubiquitaires, indispensables à la survie cellulaire, comme les gènes des enzymes de la glycolyse. Ces gènes sont appelés **gènes domestiques** ou *house keeping* et présentent des caractéristiques communes :

- ✓ un taux de transcription en général faible et continu, ce qui n'exclut pas une éventuelle régulation,
- ✓ l'absence de TATA box,
- ✓ une grande richesse en séquences CG hypométhylées. Ces doublets répétés de très nombreuses fois sont rassemblés en îlots dits HTF,
- ✓ la présence, dans la région 5' non-codante, de une ou plusieurs séquences GGGGCGGG, appelées GC box, sites de fixation de facteurs de régulation de la transcription.

4.1.5. Les pseudo-gènes

Il s'agit de séquences non-fonctionnelles (ni transcrites, ni traduites), du fait d'un excès de codon stop, d'un défaut de codon initiateur méthionine ou d'une absence de région promotrice. De tels pseudo-gènes ne sont pas rares.

4.2. L'ADN RÉPÉTÉ

Il n'est pas codant et le COT permet de distinguer deux catégories :

4.2.1. L'ADN hautement répétitif

Ses séquences peuvent être localisées.

Il correspond à l'**ADN satellite** observé en centrifugation et aux bandes C des chromosomes, c'est-à-dire à l'hétérochromatine. Il s'agit de séquences en tandem, retrouvées en particulier au niveau des centromères et des télomères.

Certaines séquences sont diffuses : les microsatellites.

Il s'agit d'un exemple extrême de répétition en tandem, où le motif varie entre 1 et 4 nucléotides (le plus fréquemment 2) et où le nombre de répétitions ne dépasse pas la quarantaine. Leur distribution dans le **génome** (tous les 25-100 kb) les rendent extrêmement précieux dans les analyses génomiques. Les motifs de taille 1 sont dits « polymorphiques mononucléotidiques » (*SNP* en anglais).

4.2.2. L'ADN moyennement répétitif

Il est constitué de séquences répétées plus longues que dans la catégorie précédente et dispersées dans le génome. Il correspond à de l'ADN mobile (**rétroposons**). Une catégorie particulière est représentée par les séquences Alu, qui sont formées de répétition de dinucléotides AT.

5. *EXPRESSION DES GÈNES*

5.1. TRANSCRIPTION

C'est la synthèse d'une copie d'ARNm à partir d'une séquence nucléotidique particulière d'ADN. L'ARNm a une structure qui présente 3 différences avec celle de l'ADN : il est monocaténaire, la thymine est remplacée par l'uracile et le sucre est un ribose et non un désoxyribose. La **transcription** nécessite une matrice d'ADN monocaténaire, une enzyme (l'ARN polymérase), des nucléotides, des cations, des facteurs protéiques et de molécules énergétiques comme le **GTP**. L'ARN polymérase assure la séparation des brins à transcrire et effectue la transcription proprement dite. Un seul brin est transcrit, la transcription étant déterminée par la localisation des séquences promotrices. Le nombre de molécules de polymérase engagées dans la transcription d'un gène est proportionnel au taux de transcription de ce gène. La transcription comporte différentes étapes :

L'initiation

La transcription débute par la fixation de l'ARN polymérase sur la région promotrice, au niveau de la TATA box, ce qui permet de définir de façon précise le site d'initiation. La transcription proprement dite commence 30 bases en aval de la TATA box. La fixation de l'ARN polymérase assure la séparation des deux brins d'ADN au niveau de ce site. L'initiation est achevée quand le premier nucléotide est incorporé. Le rôle du promoteur est capital à cette étape.

L'élongation

Cette étape est caractérisée par l'addition des nucléotides, de façon covalente, à l'extrémité 3' de la chaîne d'ARNm en croissance. L'enzyme avance le long de la chaîne, en dissociant la double hélice. On a ainsi le déplacement d'un court segment où, transitoirement, l'un des deux brins de l'ADN est simple brin et l'autre est un hybride ARN-ADN.

La terminaison

C'est une étape très mal connue. Elle s'effectue très en aval du point de polyadénylation. Lorsqu'il y a reconnaissance d'un signal d'arrêt, la dernière base est ajoutée à la chaîne d'ARNm, puis l'hybride ARNm-ADN est rompu et l'ADN retrouve son état d'origine, double brin.

5.2. MATURATION DES ARNm

Il s'agit d'une série de modifications du transcrit ARNm primaire, nécessaires pour permettre sa traduction ultérieure. La maturation des messagers a lieu dans le noyau. Elle est caractéristique des **eucaryotes**.

5.2.1. Fixation d'une coiffe méthylée

Elle représente la première étape de la maturation du messager. Il s'agit de la fixation d'une guanine méthylée sur l'extrémité 5' de l'ARNm.

5.2.2. Polyadénylation

Une fois synthétisés, les ARNm sont clivés dans leur partie 3', une vingtaine de bases en aval d'une séquence AAUAAA. Cette séquence est une séquence de reconnaissance pour la coupure. Après cette coupure, une enzyme nucléaire, la **polyA polymérase** fixe un nombre variable de A, pouvant aller jusqu'à 200 bases consécutives, sans utiliser de matrice ADN, à l'extrémité 3' du transcrit. Cette queue polyA joue un rôle dans la stabilité des ARN messagers.

5.2.3. Epissage ou excision des introns du transcrit primaire

L'**épissage** est un phénomène complexe qui fait intervenir trois sites :
- ✓ le site donneur : il correspond à une **séquence consensus** GU à l'extrémité 5' de l'intron,
- ✓ le site de branchement : il contient une base A située une vingtaine de bases en amont de l'extrémité 3' terminale de l'intron,
- ✓ le site accepteur : il correspond à l'extrémité 3' de l'intron.

L'épissage se déroule en étapes successives (figure 12) :
- ✓ coupure de l'ADN au niveau du site donneur, en 5', de la guanine de la séquence consensus GU,
- ✓ l'extrémité 5' libérée du site donneur forme un lasso, en réalisant une liaison phosphodiester 5'-2' avec l'A du site de branchement. Il y a alors constitution d'un **épissosome** par l'association de protéines et de petits ARN nucléaires, appelés snRNA (small nuclear RNA),
- ✓ enfin une trans-estérification va raccorder les deux exons et l'intron est libéré dans le milieu sous forme d'un lasso.

5.3. LA TRADUCTION

La **traduction** est l'ensemble des mécanismes qui permettent la synthèse des protéines à partir des ARNm.

5.3.1. Les acteurs

L'étape de traduction implique différents types d'ARN :

- ✓ les **ARN messagers** issus de la transcription et de la maturation,
- ✓ les **ARN de transfert** (ARNt), qui jouent le rôle de transcodeurs. L'ARNt constitue un adaptateur universel entre l'ARNm et les acides aminés, dont la succession constituera la protéine. Il est formé par une succession de nucléotides. Sa

structure secondaire est comparable à un trèfle, avec, aux extrémités opposées, l'anticodon complémentaire du codon de l'ARNm et la branche acceptrice, terminée par une séquence CAA, sur laquelle se fixe l'acide aminé (figure 13). Cette molécule présente de nombreuses bases appariées, formant des séquences spécifiques d'un amino-acide et d'une espèce, maintenant la stabilité des tiges doubles brin de la structure en trèfle. La molécule comporte également trois structures de type « feuilles » mono-caténaires, en grande partie invariantes (c'est-à-dire indépendantes de l'amino-acide et de l'espèce).

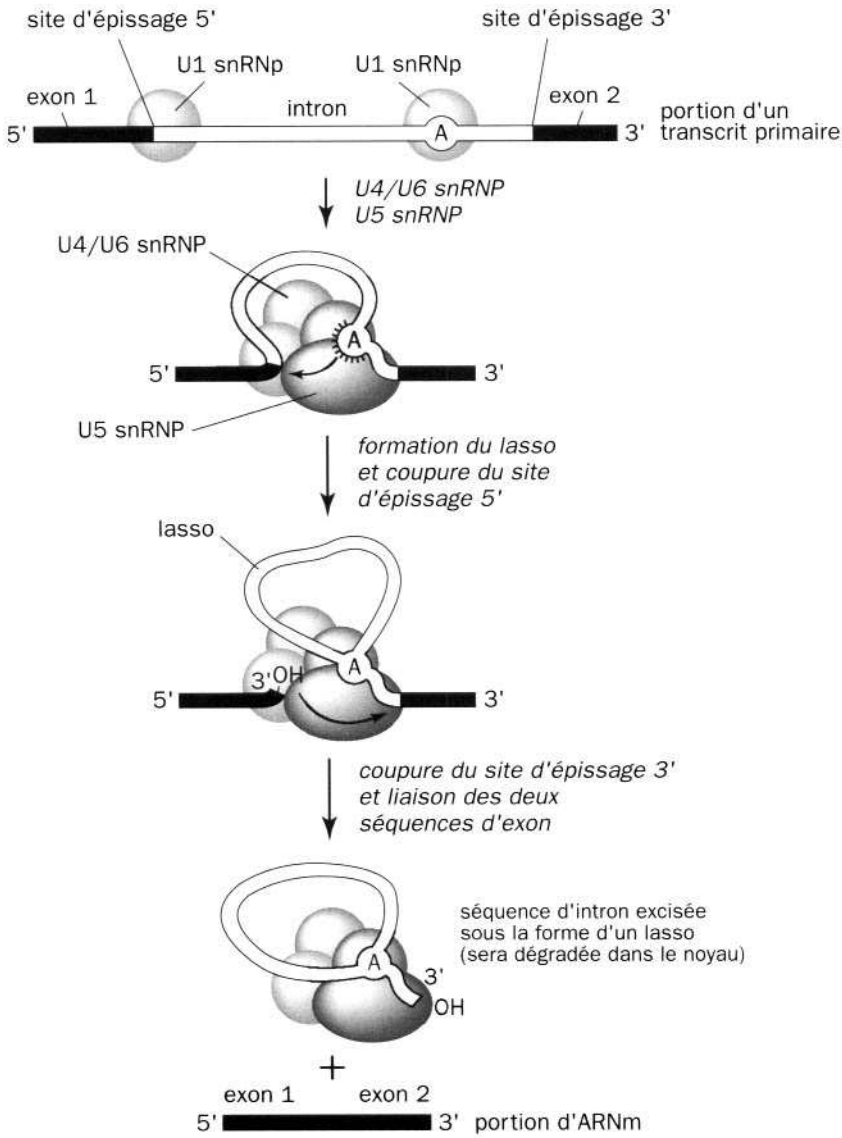


Figure 12 - Schéma de l'épissage d'un ARN messager
(d'après ALBERTS *et al.*, 1998, © Routledge/Taylor & Francis Books, Inc.)

Un ARNt possède une double spécificité, pour le codon de l'ARNm d'une part et pour l'acide aminé fixé au site accepteur d'autre part. Les mécanismes de complémentarité entre le codon et l'anticodon reposent sur la complémentarité des bases.

Remarque *- les ARNt sont utiles pour résoudre des problèmes stériques (c'est-à-dire un manque de place) ; en effet, ils permettent de garder à distance les AA, qui sont beaucoup plus volumineux que les codons pour lesquels ils sont spécifiques.*

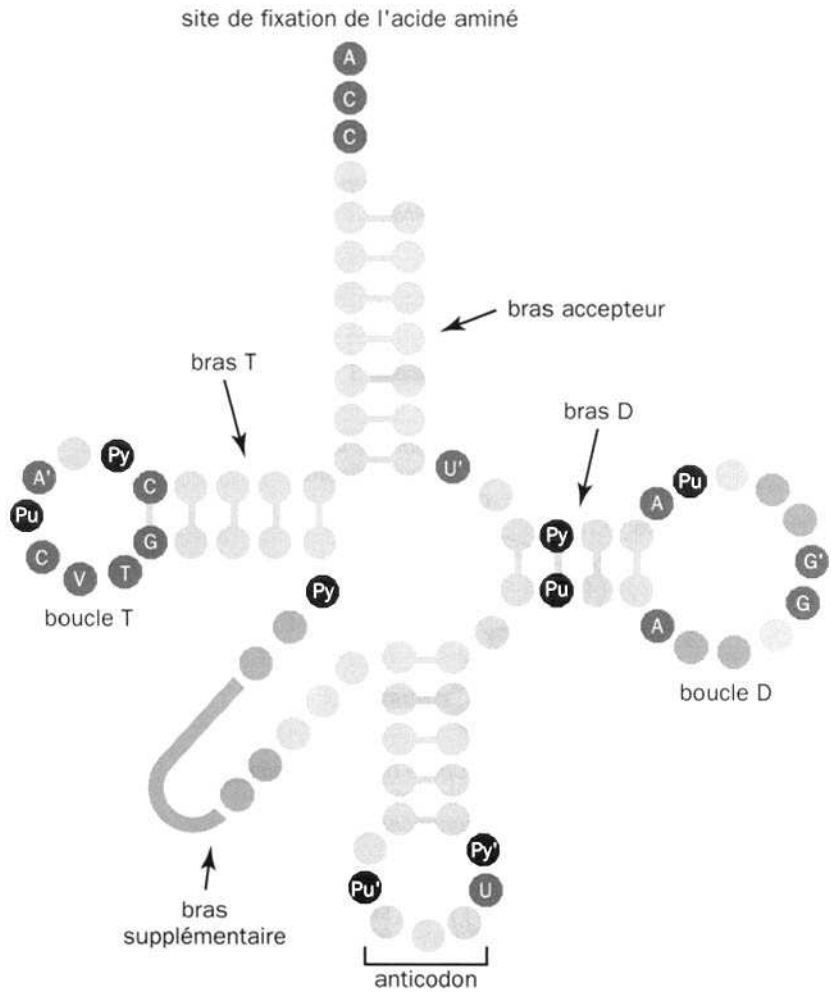


Figure 13 - Schéma d'un ARN de transfert (d'après LEWIN, 2000)

✓ les **ARN ribosomaux**, organisés en un organite, le **ribosome**. Les ribosomes sont constitués de deux types d'ARN : le type 30 S (valeur de son **coefficient de sédimentation**) constituant la petite sous-unité et le type 50 S constituant la grande sous-unité.

5.3.2. Les différentes étapes

La traduction se décompose en 3 étapes (figure 14) :

L'initiation

Cette étape fait intervenir un complexe formé de **GTP** et d'une série de facteurs protéiques. Le signal du début de la traduction est la séquence ATG qui correspond au codon méthionine. Ce complexe interagit avec la petite sous-unité du ribosome. A la fin de cette étape, l'ARNt initiateur se trouve au niveau de la grande sous-unité du ribosome, en regard d'une zone appelée site P ou site peptidique,

L'élongation

En fin d'initiation, l'ARNm se trouve associé à la petite sous-unité du ribosome. L'ARNt initiateur, chargé de sa méthionine, est lui en contact avec, d'une part, le codon initiateur de l'ARNm par l'intermédiaire de sa séquence anticodon et d'autre part, la grande sous-unité au niveau du site P. Sur la grande sous-unité, juste à côté du site P, dans l'axe du codon suivant du messager, se trouve un site analogue appelé site A. C'est à son niveau que vient se fixer l'ARNt chargé suivant. Cette fixation fait intervenir des facteurs protéiques d'élongation et du GTP.

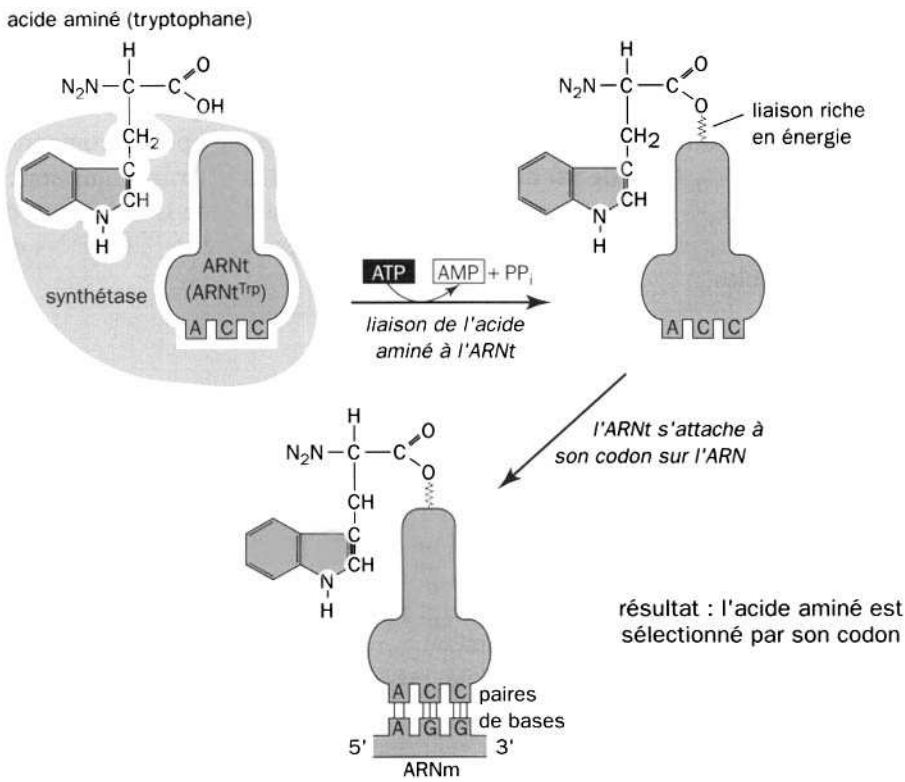


Figure 14 - Schéma des différentes étapes de la traduction
(d'après ALBERTS *et al.*, 1998, © Routledge/Taylor & Francis Books, Inc.)

Une enzyme fait passer la méthionine initiatrice, qui est sur le site P, sur l'AA qui vient d'être fixé au site A. Puis le ribosome se décale de trois bases sur l'ARNm, ce qui a pour effet de faire passer le polypeptide ainsi formé, du site A au site P, et de libérer le site A. Le système se retrouve dans l'état de départ, la chaîne polypeptidique ayant été allongée d'un AA. L'ensemble de ces étapes est renouvelé jusqu'à ce que le ribosome atteigne le site de terminaison, représenté, sur l'ARNm, par un codon stop.

La terminaison et le re-largage du ribosome

Il n'existe aucun ARNt capable de s'associer avec les trois codons stop : TAA, TGA, TAG. Cette absence d'ARNt se traduit par l'arrêt de la traduction et le re-largage ad integrum du ribosome, dissocié en ses deux sous-unités prêtes à servir pour effectuer une nouvelle traduction.

6. *RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES*

6.1. CHEZ LES PROCARYOTES

Chez les **bactéries**, le système de régulation de l'expression des gènes est relativement simple, car la régulation siège essentiellement au niveau de la transcription [7] : tout messager transcrit est immédiatement traduit en protéine. Les gènes sont regroupés en unités fonctionnelles, les **opérons**. Chaque opéron comporte un nombre variable de **gènes de structure** contigus, appelés **cistrons**, qui sont co-transcrits et co-régulés, et des séquences d'ADN responsables de la régulation de la transcription. Il existe deux grands types d'opérons : les opérons inductibles et les opérons répressibles.

6.1.1. Les opérons inductibles

L'exemple typique est l'opéron lactose, qui exprime la β-galactosidase (enzyme dégradant le lactose en glucose et galactose). Son mécanisme est le suivant :

- ✓ une protéine, le répresseur R, est synthétisée de manière constante, mais à un très faible taux, par un gène, le gène régulateur (noté i sur la figure 5),
- ✓ ce répresseur R possède une très forte affinité pour une séquence d'ADN, l'opérateur o, situé entre le promoteur et le premier gène de structure G_1. La fixation du répresseur sur l'opérateur empêche ainsi toute transcription du gène. Dans ces conditions celui-ci est « fermé »,
- ✓ l'inducteur, le lactose dans cet exemple, possède lui aussi une forte affinité pour le répresseur. Lorsqu'il est présent, il se fixe au répresseur. Cette fixation entraîne une trans-conformation du répresseur qui lui fait perdre son affinité pour l'ADN. L'opérateur est donc libéré, ce qui permet la transcription du gène.

7. Ce type de régulation, qui existe également chez les eucaryotes, sera retrouvé au paragraphe 6.2.4.

6.1.2. Les opérons répressibles

L'exemple typique est l'opéron tryptophane, qui possède les gènes codant pour les enzymes nécessaires à la synthèse du tryptophane (comme la tryptophane synthétase). Ces gènes sont transcrits à l'état basal. L'architecture des opérons répressibles est la même que celle des opérons inductibles, mais des différences les distinguent :

- ✓ il n'existe pas de répression de gènes codant pour des enzymes des voies cataboliques,
- ✓ le répresseur n'a aucune affinité pour l'opérateur tant qu'il n'est pas fixé à un effecteur (le tryptophane, dans le cas de l'opéron tryptophane), qui se comporte comme un co-répresseur.

6.2. DANS LES SYSTÈMES EUCARYOTES

Il n'existe pas de modèle général de régulation, comme chez les procaryotes, mais toute une série de mécanismes s'enchaînant, depuis le niveau chromatinien jusqu'à la traduction. On peut néanmoins noter l'existence d'une régulation globale réalisée dans le cadre d'un réseau de gènes comportant des parties connexes, dans lesquelles chaque gène (ou son produit) est lié à chaque autre gène (ou produit) par un chemin de régulation fait de la succession d'inhibitions et d'activations de gènes intermédiaires. Ce réseau a des caractéristiques comparables aux groupes d'utilisateurs web de type « petit monde » [FELL & WAGNER, 2000] et comportant des gènes maîtres, sources des principales inhibitions ou activations qu'ils déclenchent en cascade, en particulier dans la morphogenèse (voir par exemple le gène maître EMF1 (figure AII.2) dans la régulation de la floraison d'*Arabidopsis thaliana*).

6.2.1. L'environnement chromatinien des gènes actifs

Une digestion partielle de la chromatine par de faibles quantités d'une enzyme, l'**ADNase I**, permet de définir des zones d'accessibilité préférentielle à l'enzyme. Ceci permet de distinguer des sites sensibles et des sites hypersensibles :

- ✓ les sites sensibles à l'ADNase I correspondent aux gènes actifs ou à ceux qui l'ont été,
- ✓ les sites hypersensibles correspondent aux gènes très activement transcrits.

Cette sensibilité particulière démontre que les gènes actifs se trouvent dans une conformation chromatinienne particulière, qui les rend plus accessibles à l'ADNase I. Il semble donc que l'un des éléments de régulation soit d'installer les gènes qui doivent être transcrits par la cellule dans une configuration spatiale particulière.

6.2.2. Zones super-enroulées et ADN de type Z

Certaines zones super-enroulées et les zones d'ADN de type Z pourraient jouer également un rôle régulateur, en diminuant physiquement la possibilité de transcription des gènes qu'elles contiennent.

6.2.3. Régulation par méthylation

Chez les eucaryotes, la **méthylation** porte uniquement sur les cytosines qui appartiennent à un doublet CG. Cette méthylation des cytosines, situées en 5' des gènes, est associée à une diminution de leur transcription. Dans les cellules cancéreuses, l'ADN est anormalement hypo-méthylé. D'une manière générale, la méthylation semble être un signal de réduction de l'expression génique. Les séquences d'origine paternelle et maternelle sont méthylées différemment : cette différence est appelée l'empreinte parentale. De manière globale, l'ADN d'origine maternelle est beaucoup moins méthylé que celui d'origine paternelle.

6.2.4. Régulation transcriptionnelle

Malgré le fait que l'ensemble des régions codantes de l'ADN représente moins de 10% de l'ensemble de l'ADN, une même séquence peut être exprimée de façon différente, ce qui témoigne de l'influence d'éléments régulateurs :

Les éléments cis-régulateurs

Il s'agit de séquences situées dans la région 5' non-transcrite du gène et comportant :

- ✓ ***le promoteur*** - parmi ces séquences, on peut citer la TATA box, la CAAT box, mais aussi d'autres séquences qui sont, elles aussi, le pôle de fixation de séquences régulatrices,
- ✓ ***les séquences stimulatrices*** *(enhancers)* - il s'agit de séquences qui augmentent considérablement le taux de transcription du gène. Leur inversion ou leur éloignement du gène ne s'accompagne pas de l'arrêt de la transcription, mais uniquement de sa diminution.

Les facteurs trans-régulateurs

Il s'agit de facteurs protéiques qui interagissent avec les séquences cis-régulatrices. Il en existe de très nombreux types : citons la protéine CTF, qui interagit avec la CAAT box, et la protéine Sp1, qui interagit avec la GC box. Les protéines qui interagissent avec l'ADN possèdent des motifs typiques au niveau de leur zone d'interaction, en particulier la structure en doigts de gant (protéines dactyles) à laquelle est associé un atome de zinc.
Les interactions spécifiques entre ces protéines et l'ADN résultent d'une série de liaisons faibles entre les AA de la protéine et les bases, principalement au niveau du grand sillon de la double hélice d'ADN.
Parmi les protéines régulatrices de la transcription, on peut citer les récepteurs des hormones stéroïdes, qui comportent deux motifs en doigts de gant.

Régulation par choix du promoteur

Certains gènes, comme celui de l'α-amylase, comportent plusieurs promoteurs possibles. Il en résulte que le type de messager transcrit et le taux de transcription vont dépendre du choix du promoteur. Ce choix est conditionné par l'action de facteurs trans-régulateurs. Il explique l'existence d'α-amylases distinctes dans leur structure et dans leur répartition tissulaire.

6.2.5. Régulation post-transcriptionnelle

Cette régulation est réalisée au cours de la maturation et au niveau du stockage des messagers, par les mécanismes suivants :

Epissage alternatif ou **différentiel**

Il s'agit d'un processus qui permet de moduler l'expression de nombreux gènes dans des tissus différents au même moment, ou dans un même tissu à des moments différents. La cellule décide parfois d'exciser certains exons (figure 15). Ainsi, à partir d'un messager primaire unique, une série de messagers différents peuvent être obtenus. Il en résulte une série de protéines apparentées dérivant d'un même gène :

- ✓ les différents messagers obtenus codent le plus souvent pour des protéines à fonction analogue (exemple : les protéines basiques de la myéline),
- ✓ l'épissage alternatif peut aussi conduire à des protéines entièrement différentes comme la calcitonine : dans la thyroïde, le transcrit primaire est clivé, puis subit un épissage qui conduira à un messager traduit en précurseur de la calcitonine. Le même transcrit primaire, dans le cerveau, subit une maturation différente et conduit à un messager qui code pour un neuromédiateur, le CGRP[8]. Ces deux polypeptides ont des fonctions totalement différentes. Le choix de la voie de maturation dépend de facteurs cellulaires spécifiques de tissu.

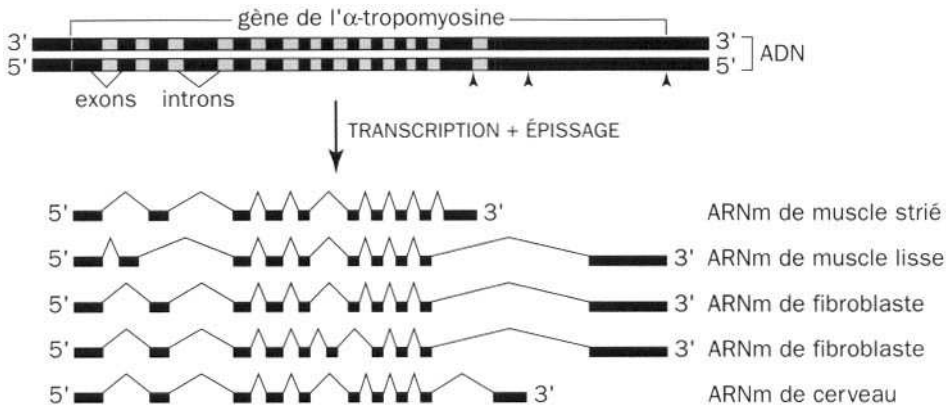


Figure 15 - Schéma de l'épissage alternatif
(d'après ALBERTS *et al.*, 1998, © Routledge/Taylor & Francis Books, Inc.)

Multiplicité du site de polyadénylation

La variation du point de terminaison permet la multiplicité de messagers à partir d'une même séquence. Prenons comme exemple le gène des **immunoglobulines** (Ig). Les Ig existent sous une forme circulante et sous une forme qui se lie à la

8. Voir par exemple H. JANSZ, K. MARTIAL, J. ZANDBERG, G. MILHAUD, A.A. BENSON, A. JULIENNE, M.S. MOUKHTAR & M. CRESSENT - Identification of a new calcitonin gene in the salmon *Oncorhynchus gorbuscha*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93** (22), 12344-8 (1996).

membrane cellulaire. Cette différence apparaît par suite de sites de terminaison distincts : le dernier exon du gène code le site de fixation de l'Ig. Quand la terminaison se fait avant cet exon, l'Ig sera sous la forme circulante. Quand elle se fait après cet exon, il s'agira d'une Ig de surface.

Modulation de la durée de vie des ARNm

Le taux de synthèse d'une protéine dépend de la concentration instantanée de l'ARNm. La région 3' des gènes joue un rôle dans la stabilisation de ces ARNm.

Stockage des ARNm

Certains ARNm sont stockés et non-traduits. Ce mécanisme constitue également une possibilité de régulation.

6.2.6. Régulation de la traduction

Les mécanismes de régulation de la traduction, au sein du **ribosome**, sont encore très mal connus, mais le rôle de l'ARN ribosomal est important [LEWIN, 2000].

7. MAINTIEN DE L'INTÉGRITÉ DE L'ADN

7.1 RÉPLICATION DE L'ADN

7.1.1. Aspects généraux

Les deux chaînes nucléotidiques, face à face dans la double hélice, étant parfaitement complémentaires, chacune peut, après leur séparation, servir de modèle pour la formation (**réplication**) d'une nouvelle chaîne complémentaire. La molécule d'ADN obtenue par réplication est constituée d'un brin parental et d'un brin néosynthétisé : la réplication est dite semi-conservative.

7.1.2. Aspects morphologiques

Chez les procaryotes

La réplication se déroule à partir d'une origine unique, appelée point d'initiation, de façon bidirectionnelle.

Chez les eucaryotes

Pendant la phase S du cycle cellulaire, la réplication débute en plusieurs points (20 000 à 30 000), appelés **réplicons** (voir chapitre III), qui fonctionnent une fois et une seule au cours du cycle. A partir de chaque réplicon, la réplication progresse de façon bidirectionnelle, jusqu'à ce que les deux réplicons adjacents soient atteints et ce, jusqu'à ce que l'ensemble de l'ADN soit dédoublé. La réplication est asynchrone et dépend de la nature des bandes chromosomiques R, G et C (voir § 3.3.2).

7.1.3. Aspects biochimiques : la fourche de réplication

Pendant la réplication, l'ADN est déroulé sous forme de deux simples brins grâce aux **hélicases**. Les brins séparés sont stabilisés sous forme simple brin grâce à la fixation des protéines SSB (single strand binding), qui empêchent la ré-association des 2 brins d'ADN. La synthèse ne peut être continue que dans le sens 5'-3', donc en regard du brin orienté 3'-5'. Le long de l'autre brin, l'ADN complémentaire est synthétisé de façon discontinue et retardée.

La réplication commence par la synthèse d'une **amorce d'ARN** (ou *primer*, synthétisé par la **primase**). La synthèse d'ADN se fait par élongation, à partir de cette amorce, sous la forme de petites séquences d'ADN, appelées fragments d'OKASAKI. L'ADN à répliquer est ensuite ouvert sur une nouvelle longueur par les hélicases... jusqu'à la duplication de l'ensemble du réplicon (figure 16). La finition du brin se fait par la destruction des amorces d'ARN, le comblement de la lacune étant effectué grâce à l'**ADN polymérase I** et la soudure du brin grâce à une **ligase**. La correction des erreurs est, quant à elle, faite pendant la néo-synthèse. Chez les eucaryotes, différentes polymérases interviennent. La **chromatine** se réorganise en **nucléosomes** avec des histones néo-synthétisées. Il n'y a pas de mélange entre les anciennes et les nouvelles **histones**.

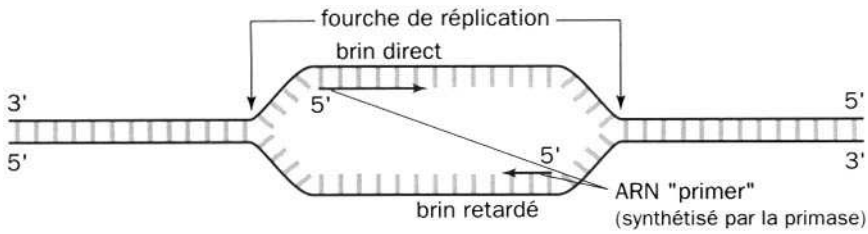


Figure 16 - Schéma général de la réplication
(d'après KAPLAN & DELPECH, 1993)

7.2. SYSTÈMES DE RÉPARATION DE L'ADN

7.2.1. Altérations de l'ADN

Les agents d'altération de l'ADN peuvent être de nature physique (rayonnement, chaleur...) ou chimique (ions H^+, **carcinogènes**...). Ils peuvent entraîner des lésions de l'ADN, sans changements structuraux importants : perte de bases, modification de bases, rupture simple ou double brin. Ces agents peuvent également modifier la structure spatiale de l'ADN, en créant des liaisons covalentes entre 2 **pyrimidines** adjacentes sur le même brin (après UV), ou entre l'ADN et des carcinogènes chimiques, ou enfin entre les 2 brins d'ADN, par pontage du fait d'une drogue.

7.2.2. Les systèmes de réparation de l'ADN

Ils complètent les systèmes de protection (comme la superoxyde dismutase) et sont mieux connus chez les procaryotes. Différents systèmes assurent la correction du brin d'ADN néo-synthétisé (par exemple l'ADN polymérase de réparation). La discrimination entre nouveau et ancien brin se fait grâce au degré de méthylation, existant sur l'ancien et non encore faite sur le néo-formé.

8. PATHOLOGIES DE L'ADN - LES MUTATIONS

8.1. DÉFINITION

Une mutation est un changement, instantané et définitif, du matériel génétique. S'il ne concerne qu'une base, elle s'appelle mutation ponctuelle. Il peut s'agir de délétions, de translocations, d'inversions, du remplacement d'une base par une autre, ou d'erreurs d'insertion. Les premières mutations (en fait, des **translocations**) ont été décrites, nous l'avons vu, chez *Oenothera lamarckiana* (l'herbe aux ânes...) par H. DE VRIES (figure 17).

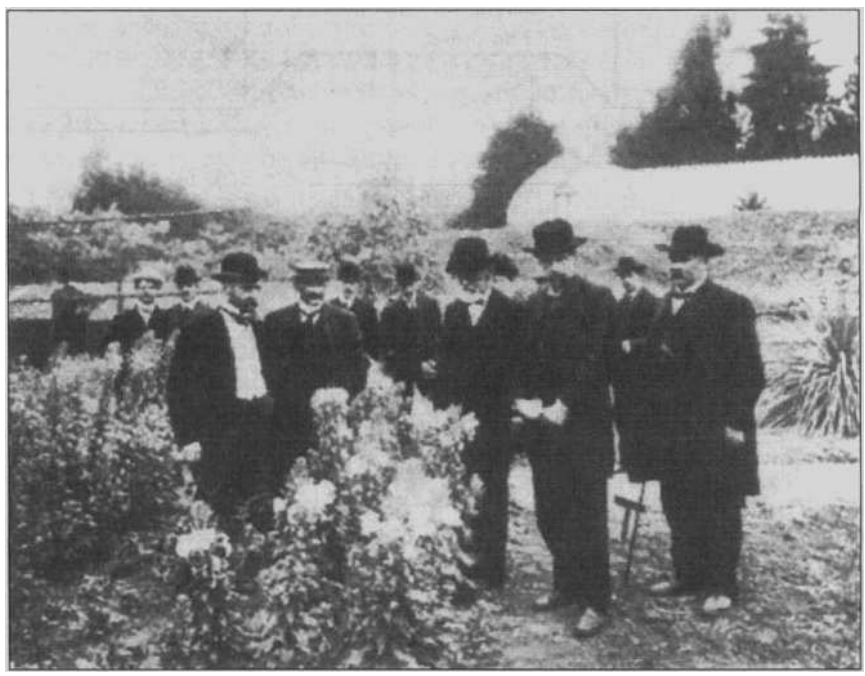


Figure 17 - Observation d'une espèce d'*Oenothera* dans le jardin botanique de l'université de Californie, à Berkeley en 1904
Au premier plan, de la gauche vers la droite E.J. WICKSON, J. LOEB, E. HILGARD, H. DE VRIES et S. ARRHENIUS (photo The Bancroft Library, University of California, Berkeley, droits réservés)

8.2. CONSÉQUENCES DE LA MUTATION

En fonction de la topographie de la mutation, ses conséquences sur l'information génétique sont variées :

8.2.1. Mutations d'une séquence non-codante

Les mutations peuvent, soit rester latentes, si elles concernent une séquence non-codante ou non-régulatrice, soit au contraire, s'exprimer lorsqu'elles touchent des régions codantes ou régulatrices.

8.2.2. Mutations dans les régions codantes

- ✓ Les mutations faux-sens modifient la signification d'un codon ; il peut en résulter un changement d'acide aminé dans la protéine correspondante. Ce changement peut retentir sur la fonction et/ou la stabilité de la protéine. La mutation peut au contraire rester totalement silencieuse.
- ✓ Si la mutation porte sur la séquence correspondant à l'un des trois codons stop de l'ARNm (TAA, TAG, TGA), elle peut entraîner une prolongation de la traduction jusqu'au codon stop suivant. Il en résulte alors une élongation de la chaîne polypeptidique.
- ✓ Les mutations non-sens résultent d'une substitution, aboutissant à la formation d'un codon TAA, TAG, ou TGA. Elles entraînent l'interruption de la traduction, plus ou moins tôt, selon leur emplacement sur le messager, et la protéine finale n'est en général pas exprimée.
- ✓ Les mutations iso-sémantiques modifient la séquence d'un codon, sans en modifier la signification. Elles sont en principe silencieuses, sauf si elles limitent l'efficacité de la traduction par la rareté de l'ARNt correspondant.

8.2.3. Mutations à effet quantitatif

Certaines mutations modifient quantitativement l'expression du transcrit primaire et/ou sa maturation. On connaît des mutations siégeant dans la région promotrice, dans le codon d'initiation de la transcription, dans les sites consensus d'épissage et dans le site de polyadénylation.

8.2.4. Mutations modifiant la longévité des ARNm

Certaines mutations modifient la demi-vie des ARNm, soit en augmentant, soit en diminuant leur stabilité.

8.2.5. Mutations silencieuses

Elles sont nombreuses. Il s'agit de la majorité des mutations introniques (quand elles ne touchent pas les séquences consensus nécessaires à l'**épissage**), et des mutations qui surviennent en dehors des gènes et de leurs séquences de régulation.

8.2.6. Mutations instables

Il s'agit d'un cas particulier où les mutations sont caractérisées par une répétition de trinucléotides, dont le nombre peut varier lors de sa transmission d'une génération à la suivante. Elles sont dues à un dérapage de l'ADN polymérase sur la matrice d'ADN lors de la réplication et sont fréquentes dans les maladies neuro-génétiques.

Les conséquences des mutations varient également selon le type cellulaire atteint :
- ✓ Si la mutation survient dans une cellule somatique, la mutation est acquise et reste somatique et ne sera pas transmise à la descendance (dans les cancers, par exemple),
- ✓ Si la mutation survient dans une cellule germinale, la mutation peut être transmise à la descendance ; elle devient alors constitutive (maladies héréditaires).

9. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En guise de conclusion, traçons quelques perspectives pour la génomique des années futures : elle deviendra beaucoup plus fonctionnelle qu'anatomique, en s'alliant en particulier à la protéomique, c'est-à-dire à l'étude des protéines, surtout dans le domaine des relations conjointes qu'entretiennent ces deux disciplines dans la régulation du métabolisme. En effet, l'imagerie bio-puce (figure 18) permet d'obtenir la matrice W d'interaction inter-génique d'un réseau de régulation génétique de type **opéron**, représentant les relations d'inhibition et d'activation entre gènes et protéines nécessaires au contrôle d'une fonction cellulaire ou tissulaire [DEMONGEOT *et al.*, 2002].

Pour calculer le terme général w_{ij} de W, nous pouvons par exemple déterminer la corrélation s-directionnelle $\rho_{ij}(s)$ entre le vecteur d'état noté $\{x_j(t-s)\}_{t\in C}$ du gène j à l'instant t – s (qui vaut 1 si le gène est exprimé et 0 sinon) et le vecteur d'état $\{x_i(t)\}_{t\in C}$ du gène i à l'instant t, t variant au cours du cycle cellulaire C de longueur $M = |C|$ et correspondant aux temps d'observation de la bio-puce [9]. Le graphe d'interaction G associé à W présente en général des caractéristiques importantes telles que des boucles positives et négatives (voir annexe II-2) [10].

---

9. $\rho_{ij}(s) = [\sum_{t\in C} x_j(t-s)\, x_i(t) - \sum_{t\in C} x_j(t-s) \sum_{t\in C} x_i(t)/M] / \sigma_j(s)\, \sigma_i(0)$,
où $\sigma_j(s) = \{\sum_{t\in C} x_j(t-s)^2 - [\sum_{t\in C} x_j(t-s)]^2 / M\}^{1/2}$.
On prendra alors : $w_{ij} = \text{sign}\,(\sum_{s=1\ldots k} \rho_{ij}(s)/k)$, si $|w_{ij}| > \eta$ et $w_{ij} = 0$, si $|w_{ij}| < \eta$,
où η est un seuil de décorrélation.

10. L'étude de l'influence de ces boucles de régulation sur la différenciation, donc sur les étapes majeures de l'embryogenèse et de la tumorogenèse, constituera sans doute le grand défi de cette première décennie du XXIe siècle.

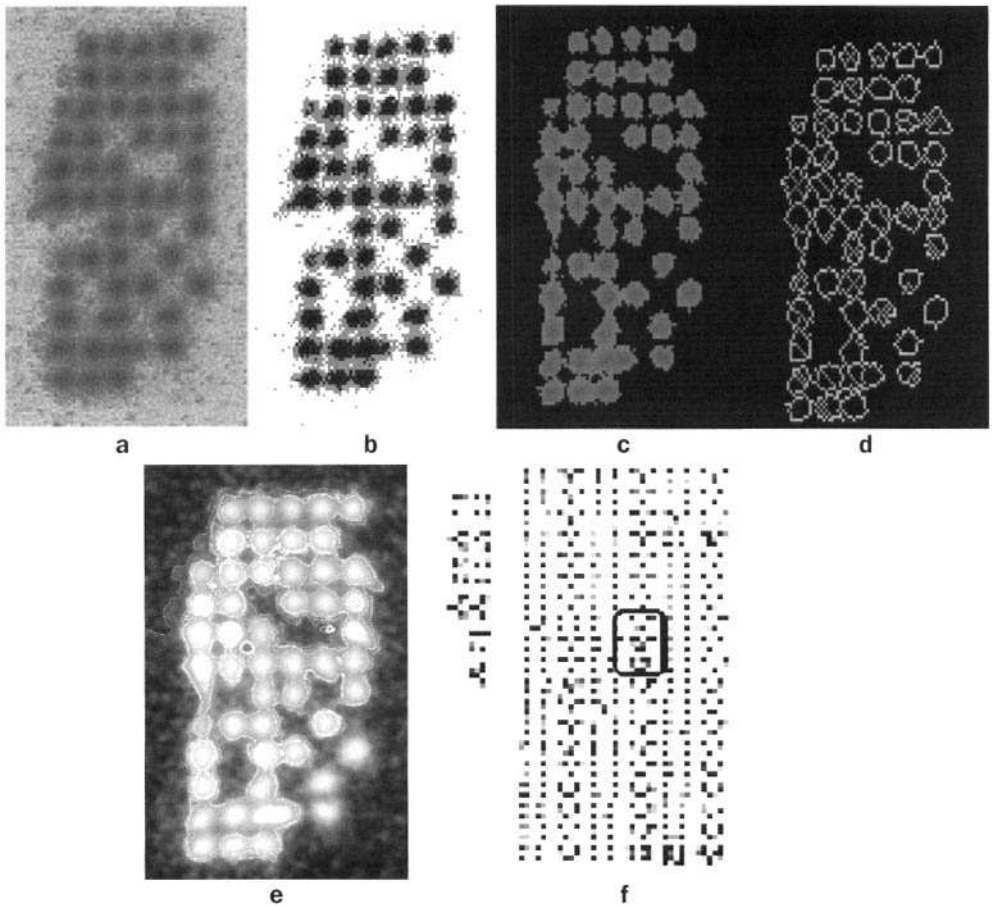


Figure 18 - Image de bio-puce destinée à l'étude des réseaux de régulation génique d'un glioblastome humain
a - données brutes ; **b** - filtrage passe-bas ; **c** - segmentation par bassins versants ; **d** - contourage par frontière de bassins versants ; **e** - contourage par trajectoire dynamique ; **f** - image standardisée finale d'activité des gènes.

En fonction des valeurs de certains paramètres tels que le coefficient de connectivité (égal au nombre d'interactions divisé par le nombre de gènes), le réseau de régulation génétique peut présenter différents comportements dynamiques (configuration fixe, cycle limite de configurations) appelés **attracteurs**, lorsque le temps d'observation augmente. Un certain nombre de résultats théoriques permettent maintenant de faire le lien entre la phénotypie observée (configurations fixes ou cycles de configurations dans l'expression des gènes au cours du cycle cellulaire des tissus étudiés) et les contraintes qu'elle exerce sur la structure interne de la matrice d'interaction W. Les deux résultats majeurs sont que l'existence d'au moins une boucle positive est une condition nécessaire à l'existence de plus d'un attracteur et que, si le nombre N de gènes est suffisamment grand et que le coefficient de connectivité est égal à 2, alors le nombre total d'attracteurs est de l'ordre

de $\sqrt{N}$ et de toute manière inférieur à 2^m, où m est le nombre de boucles positives du réseau de régulation génétique étudié.

On peut alors analyser précisément les propriétés dynamiques des **opérons** ; par exemple, dans la figure 19, l'opéron du phage μ peut présenter deux points fixes, l'un correspondant à l'état lytique de la bactérie qu'il infecte, l'autre correspondant à l'état lysogénique (état infecté de survie bactérienne). Il est remarquable de noter qu'un tel opéron, au demeurant extrêmement simple [11], possède une boucle positive (responsable des 2 états stationnaires de la dynamique) et une boucle négative (responsable de la stabilité du système) [DEMONGEOT *et al.*, 2003].

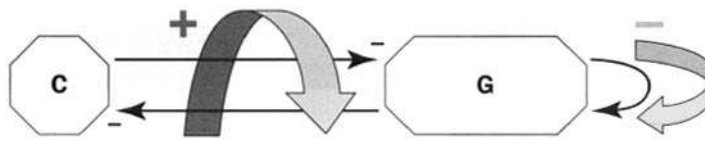


Figure 19 - Schéma de régulation de l'opéron lytique-lysogénique du phage μ, montrant la présence d'une boucle positive et d'une boucle négative

Dans un avenir proche, on assistera à la multiplication des élucidations du comportement dynamique de tels opérons ; l'évolution fonctionnelle sera prise en compte à travers des arbres phylogénétiques construits non plus à partir des homologies de séquences des gènes, mais à partir de la connaissance de leurs matrices d'interaction et de la manière dont elles évoluent d'une espèce à l'autre. On étudiera également les mécanismes qui permettent de passer par les différents états de la vie embryonnaire, qui ne sont peut-être que les transitoires d'une dynamique dont les asymptotiques sont les états tissulaires de l'organisme adulte, ce dernier entrant de nouveau dans un transitoire lors du vieillissement, du fait de la disparition de l'activité de certains gènes, donc de certaines interactions, lors de la dénaturation des télomères.

On verra également, après les grandes bases de données de la génomique anatomique (telles *Gene Data Bank*® et *Genatlas*®) et de la protéomique fonctionnelle (telle *Swiss Prot*®), se développer de grandes bases de données de patients, présentant des anomalies chromosomiques constitutionnelles (telle *HCForum*®, figure 20 et [COHEN *et al.*, 2001]) ou acquises (tel l'*Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*®), ou ayant des maladies rares d'origine familiale (telle *Orphanet*®). Ces bases permettront, sur de grands échantillons de patients, constituant une connaissance statistique brute indispensable à l'établissement d'une connaissance encyclopédique bien assise, de faire des calculs de risque à la naissance pour le conseil génétique aux familles et également de dégager de grandes lois concernant les mécanismes de ségrégation et concernant la viabilité du matériel génétique [FARAUT *et al.*, 1999, 2000 ; COHEN *et al.*, 1994, 1996].

11. L'opéron du phage μ est constitué de six gènes principaux répartis en deux blocs (voir figure 19).

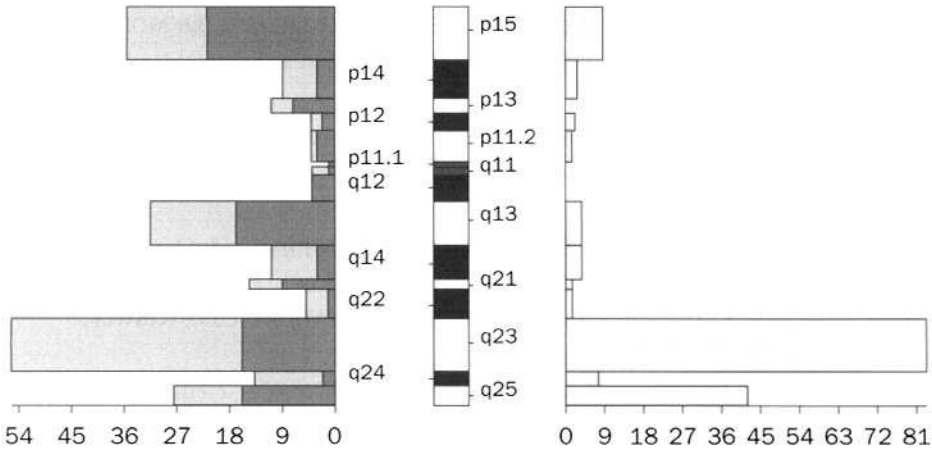


Figure 20 - Histogramme de localisation des points de cassures dues à des translocations, le long du chromosome 11, calculées dans la base de données HCForum®

Pour revenir au premier paragraphe historique de ce chapitre, on pourra par exemple, comme l'avait suggéré LAMARCK, étudier *l'influence des habitudes des corps vivants comme cause qui modifie leur organisation*: un mode d'étude de ce problème fondamental est par exemple le calcul de la corrélation entre la localisation des points de cassure physiologique (par **crossing-over**) ou pathologique (par exemple par translocation, figure 20) du **génome** et les lieux d'expression ubiquitaire des gènes, par exemple sous des contraintes environnementales (comme l'expression des gènes des enzymes de la glycolyse dans des conditions d'anaérobiose). On découvrira sans doute que la ségrégation obéit ainsi à des lois plus complexes que celles de MENDEL et MORGAN, et que les conditions de stockage et de décompaction du génome (existence d'un référentiel nucléaire tri-dimensionnel constant conduisant à des proximités fixées entre chromosomes, existence de zones fragiles du génome, dues à une transcription constante au cours du cycle cellulaire...) ont une influence importante sur la transmission et sur l'évolution du matériel génétique.

RÉFÉRENCES

G.W. BEADLE & E.L. TATUM – Genetic Control of Biochemical Reactions in Neurospora. *PNAS* **27**, 499-506 (1941).

C. BERNARD - *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Flammarion, Paris (1865, réédition A. LE VASSEUR, 1884).

G.M. DE BUFFON - *Histoire Naturelle*. Paris (1745).

O. COHEN, C. CANS, M.A. MERMET, J. DEMONGEOT & P. JALBERT - Viability thresholds for partial trisomies and monosomies. A study of 1,159 viable unbalanced reciprocal translocations. *Human Genetics* **93**, 188-194 (1994).

O. COHEN, C. CANS, H. ROTH, M.A. MERMET, P. JALBERT & J. DEMONGEOT
Cartographic study of 1156 viable unbalanced human reciprocal translocations. *Human Genetics* **97**, 659-667 (1996).

O. COHEN, M.A. MERMET & J. DEMONGEOT - HC Forum®: a web sitebased on an international human cytogenetic data base. *Nuclear Acids Research* **29**, 305-307 (2001).

J. DEMONGEOT, J. ARACENA, S. BEN LAMINE, M.A. MERMET & O. COHEN
Hot spots in chromosomal breakage: from description to etiology.
In : Comparative Genomics, D. SANKOFF & J.H. NADEAU eds., Kluwer, Amsterdam, 71-85 (2000).

J. DEMONGEOT, J. ARACENA, F. THUDEROZ, T.P. BAUM & O. COHEN - Genetic regulation networks: circuits, regulons and attractors. *C.R. Biologies* **326**, 140-149 (2003).

J. DEMONGEOT, J.P. FRANÇOISE, M. RICHARD, F. SENEGAS, T.P. BAUM
A differential geometry approach for biomedical image processing.
C.R. Acad. Sci., Sciences de la Vie **325**, 367-374 (2002).

T. FARAUT & J. DEMONGEOT - Benefits of a model of segregation for the understanding of chromosomal evolution. *In : Comparative Genomics*, D. SANKOFF & J.H. NADEAU eds., Kluwer, Amsterdam, 13-17 (2000).

T. FARAUT, M.A. MERMET, J. DEMONGEOT & O. COHEN - Cooperation of selection and meiotic mechanisms in the production of imbalances in reciprocal translocations. *Cytogenet. & Cell Genet.* **87**, 310-316 (1999).

D.A. FELL & A. WAGNER - The small world of metabolism. *Nature Biotechnol.* **18**, 1121-1122 (2000).

E. HAECKEL - *Anthropogenie oder Entwickelungsgeschichte des Menschen.* Engelmann, Leipzig (1874).

F. JACOB, D. PERRIN, C. SANCHEZ & J. MONOD - L'opéron : groupe de gènes à expression coordonnée par un opérateur. *C.R. Acad. Sci.* **250**, 1727-1729 (1960).

J.B. LAMARCK - *Recherches sur l'organisation des corps vivants.* Maillard, Paris (1802, réédition Fayard, Paris, 1986).

B. LEWIN - *Genes VII.* Oxford Univ. Press, Oxford, UK (2000).

G. MENDEL - Experiments in Plant Hybridisation. *Verb. Naturf. Ver. Brünn* **4**, 40-94 (1865).

T.H. MORGAN, A.H. STURTEVANT, H.J. MULLER & C.B. BRIDGES - *Le mécanisme de l'hérédité* (traduction française M. LAMERTIN, Bruxelles (1923).

M.K. RICHARDSON, J. HANKEN, L. SELWOOD, G.M. WRIGHT, R.J. RICHARDS, C. PIEAU & A. RAYNAUD - HAECKEL, embryos, and evolution. *Science* **280**, 983-984 (1997).

H. DE VRIES - *Die Mutationstheorie (The mutation theory).* Kraus Reprint, New York (1901, réédition 1969).

C.H. WADDINGTON - *Principles of Embryology.* Macmillan, New York (1966).

J.D. WATSON & F.H. CRICK - Molecular structure of nucleic acids. A structure for Deoxyribose Nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738 (1953).

POUR EN SAVOIR PLUS

B. ALBERTS, M. RAFF, A. JOHNSON, K. ROBERT, D. BRAY, J. LEWIS, K. ROBERTS & P. WALTER - *Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York (1998).

D.J. DEPEW & B.H. WEBER - *Darwinism Evolving: Systems dynamics and the genealogy of natural selection*. Bradford/MIT Press, Cambridge Mass. (1995).

J.C. KAPLAN & M. DELPECH - *Biologie moléculaire et médecine*. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris (1993).

H. LODISH, A. BERK, S. L. ZIPURSKY, P. MATSUDAIRA, D. BALTIMORE & J. DARNELL - *Molecular cell biology*. Freeman, New York (2002).

E. PASSARGE - *Atlas de génétique*. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris (1995).

P. WALTER, K. ROBERTS, A. JOHNSON, K. ROBERTS, J. LEWIS, M. RAFF, A. JOHNSON & B. ALBERTS - *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York (2002).

J.D. WATSON *et al.* - *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin/Cummings, Redwood City (1987).

Références des autorisations

Figures 7, 12, 14 et 15 : Copyright 1998. D'après *Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell* by B. ALBERTS, M. RAFF, A. JOHNSON, K. ROBERT, D. BRAY, J. LEWIS, K. ROBERTS & P. WALTER, Garland Publishing, New York. Reproduit avec l'autorisation de Routledge/Taylor & Francis Books, Inc.

ANNEXE II-1

L'EXPÉRIENCE PRINCEPS DE MILLER ET L'ARN ARCHÉTYPAL

Jacques DEMONGEOT

En 1953, MILLER (suivant une idée d'UREY) utilisa une décharge électrique entre deux électrodes de tungstène dans un gaz comprenant CH_4, NH_3 et H_2O (représentant les décharges dues à la foudre dans l'atmosphère primitive), et il obtint 10 des 20 acides aminés constituant les protéines. Les sucres et les nucléotides peuvent être obtenus dans des conditions pré-biotiques similaires (voir les expériences de BUTLEROW en 1861 pour les sucres, et de FOX en 1984 pour les protéines et les nucléotides).

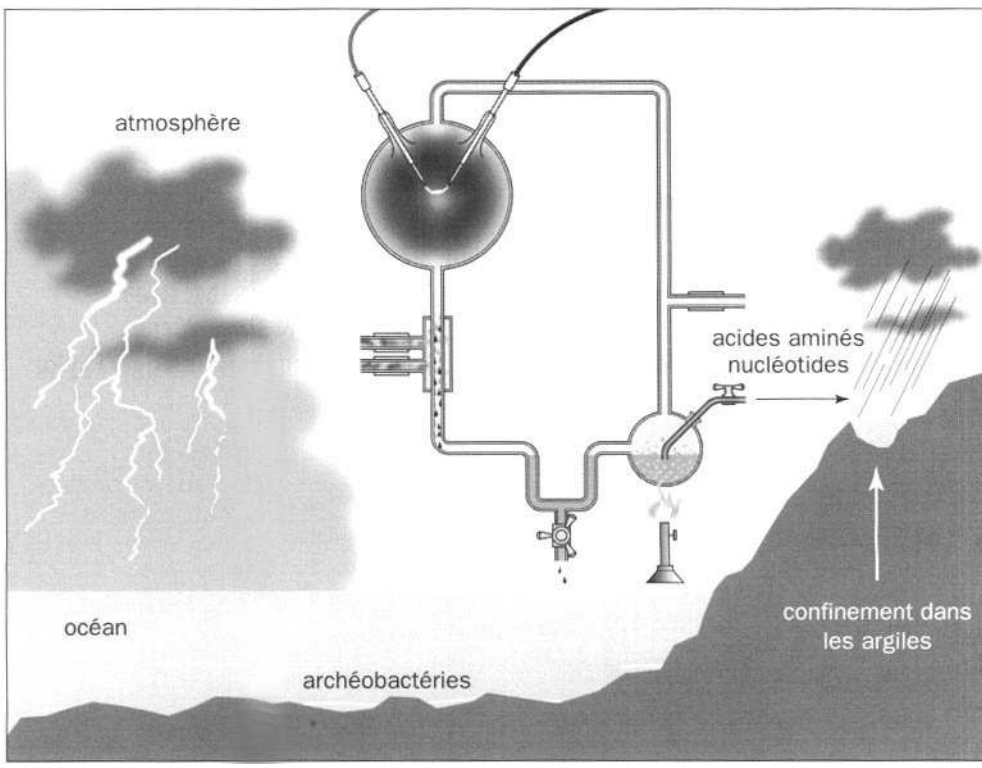


Figure AII-1.1 - Expérience de MILLER

Toutes les briques de base du vivant, **acides aminés** (AA) et **nucléotides**, peuvent donc être synthétisées dans la soupe primitive. Nous savons que ces briques ont une tendance naturelle à former des auto-assemblages spécifiques par **liaisons covalentes** (polypeptides d'une part et polynucléotides d'autre part) et mixtes (AA-nucléotides) par liaisons faibles (de type VAN DER WAALS ou de type électro-magnétique), unissant par exemple de manière préférentielle un AA à ses anti-codons [12,13]. Les auto-assemblages spécifiques se dénaturent sous l'effet d'agents physico-chimiques, mais peuvent être protégés de la dénaturation s'ils forment des auto-assemblages mixtes thermodynamiquement favorables.

Supposons que la structure polynucléotidique auto-assemblée soit une molécule circulaire d'ARN et que la structure polypeptidique associée soit un enchaînement d'AA associés à des triplets successifs de cet ARN, et appelons ARNt primitif la structure d'ARN circulaire minimale capable de fixer n'importe lequel des 20 AA sur un de ses triplets.

Recensons alors les différentes espèces moléculaires intervenant dans ces auto-assemblages :

B pool des nucléotides isolés (bases puriques et pyrimidiques)
A ARN circulaire
tA ARN circulaire complémentaire de A (ARNt primitif)
AtA ADN circulaire
Q pool des AA isolés
tAQ complexe ARNt-AA
$\mathbf{P_n}$ pool des polypeptides comportant n AA

Les réactions ayant lieu entre les espèces moléculaires ci-dessus sont :

$$\underset{J}{B} \overset{Lj}{\leftrightarrow} A,\ B \overset{Lj}{\leftrightarrow} tA,\ A + tA \overset{Mk}{\leftrightarrow} AtA,\ tA + Q \overset{Nm}{\leftrightarrow} tAQ,\ tAQ + P_n \overset{p}{\rightarrow} tA+P_{n+1},\ P_{n+1} \overset{Rq}{\leftrightarrow} P_n + Q$$

On peut montrer que ce système réactionnel a un point fixe stable donné par les équations suivantes :

$$[A^\circ] = [tA^\circ] = BL,\ [AtA^\circ] = M[A^\circ]^2,\ [tAQ^\circ] = NmBLQ / (m+pQ^n / R^{n-1}),$$

en supposant les concentrations des divers pools constantes, égales à B, Q et $P_n = Q^n / R^{n-1}$.

Si l'on désire avoir la concentration maximum [tAQ°] d'ARN de transfert primitif ligandé (supposé thermodynamiquement favorable vis-à-vis de la dénaturation), on doit maximiser la constante d'équilibre N, donc l'affinité de tA pour le pool Q. Ceci peut être obtenu, sous contrainte de longueur minimale pour tA, donc pour A,

12. J. MAYNARD-SMITH & E. SZATHMARY - *The major transitions in evolution*. Oxford Un. Press, Oxford (1999).

13. M.K. HOBISH, N.S.M.D. WICKRAMASINGHE & C. PONNAMPERUMA - Direct interaction between amino-acids and nucleotides as a possible physico-chemical basis for the origin of the genetic code. *Advances in Space Research* **15**, 365-375 (1995).

en résolvant le problème d'optimisation combinatoire suivant : l'ARN circulaire tA (resp. A) doit être de longueur minimale et tA (resp. A) offrir au moins une fois, dans sa séquence, un anti-codon (resp. un codon) de chaque AA du pool Q, pour que tA puisse fixer tout AA de Q situé dans son voisinage. Ce problème, résolu dans [14], n'a pas de solution si l'on suppose que A a 20 (c'est-à-dire le nombre minimal compatible avec le problème posé) ou 21 nucléotides, mais il possède, si A en a 22, $64 \times 20 = 1280$ solutions optimales parmi les $4^{22} \sim 16.10^{12}$ solutions possibles, cela à condition que les triplets de A soient lus en se chevauchant depuis le codon de la méthionine, jusqu'à un des codons stop.

Une des solutions optimales, notée AL, parmi les 1280 existantes, est donnée par la séquence circulaire suivante, dans laquelle on trouve une fois et une seule un codon représentant l'une des 20 classes de codons synonymes, codant pour les 20 AA (figure AII-1.2).

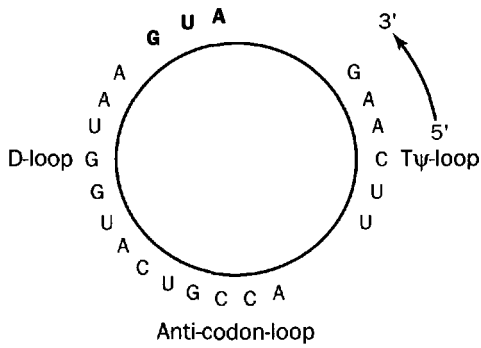


Figure AII-1.2
ARN circulaire ArchétypaL (AL)

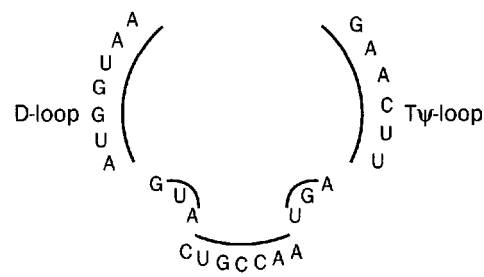


Figure AII-1.3
Séquence des boucles de l'ARNt de glycine chez *Oenotheria lamarckiana*

Si l'on recherche maintenant, parmi les ARN de transfert actuels, un ARNt offrant une séquence consensus significative ($p < 10^{-9}$) avec l'ARN primitif ci-dessus, prise dans la concaténation des séquences de ses boucles (loops) invariantes au sens de Lewin [15], on trouve l'ARNt de glycine d'*Oenotheria lamarckiana* [16], dont les boucles ont la structure de la figure AII-1.3. Il est à noter que les ARN A et tA archétypaux, notés AL, sont presque palindromiques (figure AII-1.4), ce qui augmente encore la probabilité de maturation au hasard de telles structures et ce qui permet leur repliement sous forme condensée de type « épingle à cheveux ».

14. J. DEMONGEOT & J. BESSON - Code génétique et codes à enchaînement I & II. *C.R. Acad. Sc.*, Série III **296**, 807-810 (1983) & **319**, 520-528 (1996).

15. B. LEWIN - *Genes VII*. Oxford Univ. Press, Oxford, UK (2000).

16. S. BINDER, W. SCHUSTER, J.M. GRIENENBERGER, J.H. WEIL & A. BRENNICKE - Genes for Gly-, His-, Lys-, Phe-, Ser- and Tyr-tRNA are encoded in *Oenothera* mitochondrial DNA. *Current Genetics* **17**, 353-358 (1990).

```
C A U G G U A A G U A
I I   I I I I I I I
G U G C C A U U C A A
```

Figure AII-1.4 - Palindrome commun à A et tA (forme AL)

On peut aussi noter que les 2560 (1280×2) structures cycliques optimales correspondant aux ARN A et tA construits à partir du pool B (notés brièvement AB) sont proches, sur la courbe de GATLIN [17] (liant la proportion p en GC à la redondance $I = 1 + p \log_2 p + (1 - p) \log_2 (1 - p)$ entre 2 bases consécutives), de l'ADN mitochondrial (H. mito), qui code pour les ARNt (figure AII-1.5). De plus, les ARN AB ont tous un nombre approximativement égal de A et U (resp. de G et C), ce qui laisse supposer qu'ils ont été obtenus dans des conditions de polymérisation analogue, à partir du pool B (ce qui justifie *a posteriori* l'égalité des constantes cinétiques L et j de leurs réactions de maturation-dénaturation).

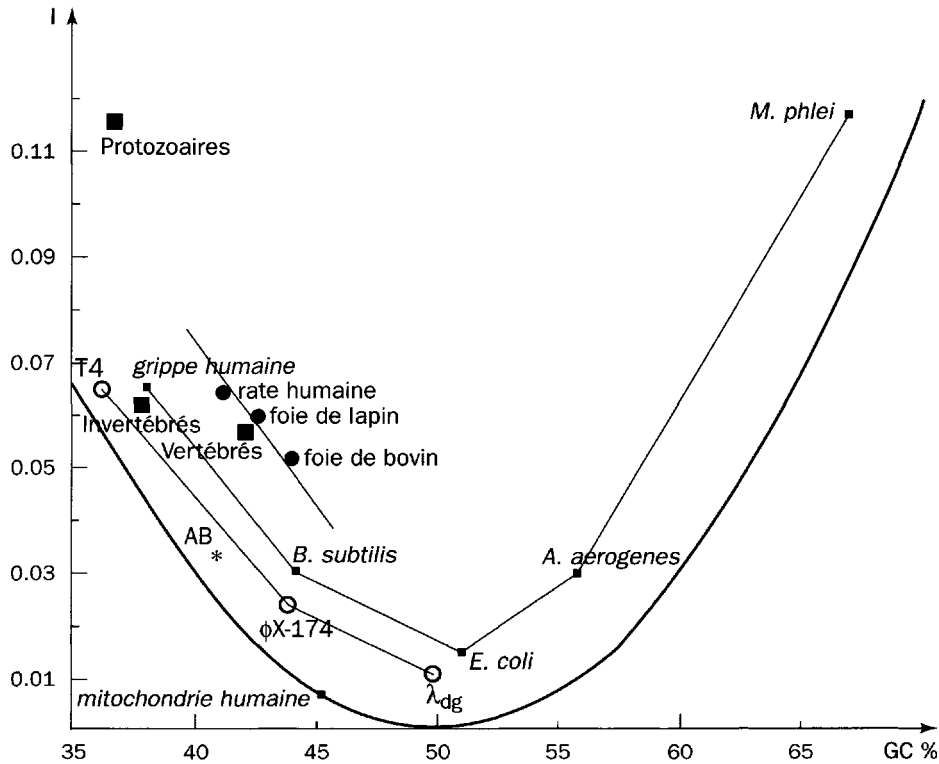


Figure AII-1.5 - Diagramme de GATLIN représentant la redondance I en fonction du % en GC

17. L.L. GATLIN - The information content of DNA II. *J. Theor. Biol.* **18**, 181-194 (1968).

ANNEXE II-2

NOTION DE RÉSEAU DE RÉGULATION GÉNÉTIQUE

Jacques DEMONGEOT

La notion de réseau de régulation génétique était déjà sous-jacente aux réflexions de DELBRÜCK [18], qui, au cours d'un des premiers congrès du CNRS en 1949, a déclaré que, pour obtenir une différentiation cellulaire, il fallait que le réseau de régulation génétique correspondant ait plusieurs états stationnaires. Cette conjecture fut complétée, 30 années plus tard, par R. THOMAS [19] qui ajouta que, pour avoir plusieurs états stationnaires, il fallait au moins une boucle positive dans la matrice d'interaction du réseau, égale par exemple à :

$$A = \begin{pmatrix} a_{11} & 0 & a_{13} \\ a_{21} & a_{22} & 0 \\ 0 & a_{32} & 0 \end{pmatrix}$$

où l'élément courant a_{ij} est égal à l'intensité de l'action du gène j sur le gène i, ou, pour simplifier, si l'on désigne par x_i l'activité du gène i (égale à 1, si i s'exprime et à 0, sinon), on peut supposer a_{ij} égal à + 1, si j induit (ou active) i, à – 1, si j réprime (ou inhibe) i et à 0, si j n'a pas d'action sur i. Il existe une boucle positive (resp. négative) entre j et lui-même, s'il existe des gènes intermédiaires k, l, ..., m, n, tels que :

$$a_{ij}\, a_{ki}\, a_{lk} \ldots a_{nm}\, a_{jn} > 0 \text{ (resp. } < 0),$$

ce qui correspond au fait que la chaîne d'interactions :

$$x_j \to x_i \to x_k \to x_l \to \ldots \to x_m \to x_n \to x_j$$

ou, plus simplement :

$$j \to i \to k \to l \to \ldots \to m \to n \to j,$$

comporte un nombre pair (resp. impair) d'interactions négatives.

Dans l'exemple de la matrice A ci-dessus, si nous supposons strictement positifs tous les a_{ij} non-nuls, il y a par exemple une boucle positive entre le gène 3 et lui-même, qui passe par 1 et 2. Il y a également une boucle positive (dite d'autocatalyse) entre 1 et lui-même, et entre 2 et lui-même.

---

18. M. DELBRÜCK - Discussion. *In* : Unités biologiques douées de continuité génétique, *Colloques Internationaux CNRS* **8**, 33-35 (1949).

19. R. THOMAS - On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations. *Springer Series in Synergetics* **9**, 180-200 (1980).

Un résultat théorique récent (annoncé en partie dans [20]) montre que, dans un système différentiel ayant un champ de vecteurs vitesse rentrant dans une sphère suffisamment éloignée de l'origine, une boucle positive est une condition nécessaire pour avoir plusieurs points fixes[21], les boucles négatives étant, elles, responsables de la stabilité. La conjecture de DELBRÜCK-THOMAS est donc démontrée. D'autre part, de nombreux graphes d'interaction entre gènes sont en cours d'élucidation, comme celui gouvernant le réseau de gènes de la floraison d'*Arabidopsis thaliana*. Le réseau de régulation correspondant (figure AII-2, en haut) comporte 11 gènes, 22 interactions, 2 boucles négatives et 4 positives, dont 2 positives indépendantes (c'est-à-dire dans des composantes connexes différentes), apportant chacune 2 états stationnaires, soit 4 états stationnaires en tout. Son coefficient de connectivité (nombre d'interactions/nombre de gènes), vaut 2. Dans ce cas, une conjecture due à KAUFFMAN[22], démontrée dans [23,24], prédit l'existence de $\sqrt{n}$ attracteurs pour la dynamique du réseau de régulation, si n est le nombre de gènes et si le nombre d'interactions est égal à 2n (coefficient de connectivité égal à 2) : on peut donc effectivement s'attendre à $11^{1/2} \sim 4$ points fixes pour la dynamique du réseau de la floraison d'*Arabidopsis thaliana*, dont l'obtention dépend des conditions initiales d'expression des gènes de floraison. On peut ainsi obtenir, suivant que le réseau est celui présenté ci-dessus ou bien a été amputé d'une partie de ses interactions, tout ou partie des tissus résultant de la différentiation cellulaire prédite par DELBRÜCK, c'est-à-dire les pétales, sépales, étamines et carpelles (figure AII-2, en bas à gauche). En effet, en jouant sur les interactions du réseau, les botanistes ont pu obtenir des fleurs n'ayant qu'une partie de ces tissus. Ces découvertes sont l'aboutissement d'une maturation des concepts et d'une innovation expérimentale remarquables.

Rappelons-en le contexte historique : la célèbre théorie de GOETHE de 1794, sur la métamorphose des feuilles de la rose prolifère, ne reconnaissait dans ce rosier qu'un seul tissu (figure AII-2, en bas à droite). Elle supposait une transformation graduelle des feuilles en sépales, des sépales en pétales et des pétales en étamines et pistil. La couleur commune (verte) de ces divers tissus avait conduit GOETHE à une conclusion erronée. L'étude actuelle, par la technique des biopuces, permet de démasquer, derrière des phénotypes identiques, des expressions géniques distinctes.

---

20. J. DEMONGEOT - Multi-stationarity and cell differentiation. *J. Biol. Syst.* **6**, 1-2 (1998).
21. O. CINQUIN & J. DEMONGEOT - Positive and negative feedback : striking a balance between necessary antagonists. *J. Theor. Biol.* **216**, 229-241 (2002).
22. S. KAUFFMAN - *The Origins of Order*. Oxford University Press, Oxford, England (1993).
23. J. ARACENA, S. BEN LAMINE, M.A. MERMET, O. COHEN & J. DEMONGEOT - Mathematical modelling in genetic networks : relationships between the genetic expression and both chromosomic breakage and positive circuits. *In* : *BIBE 2000*, N. BOURBAKIS ed., *IEEE Proc.*, Piscataway, 141-149 (2000).
24. J. ARACENA, S. BEN LAMINE, M.A. MERMET, O. COHEN & J. DEMONGEOT - Mathematical modelling in genetic networks : relationships between the genetic expression and both chromosomic breakage and positive circuits. *IEEE Trans. Systems Man Cyber.* (sous presse).

Ce résultat est à rapprocher d'une constatation simple : l'homme a environ 35 000 gènes en interaction et la plupart des réseaux connus ont un coefficient de connectivité valant entre 1.5 et 3 (opéron lactose, opéron Cro du phage λ, opéron lysogénique-lytique du phage μ, réseau de la floraison d'*Arabidopsis thaliana*, réseau de la gastrulation de la drosophile...). En supposant qu'il en soit de même pour la matrice d'interaction globale humaine, on peut s'attendre à observer de l'ordre de grandeur de $35\,000^{1/2} \approx 200$ tissus différents dans le corps humain, résultant de la différentiation cellulaire, c'est-à-dire de l'expression du réseau de régulation en fonction des diverses conditions initiales présentes au cours de la vie embryonnaire, ce qui est effectivement le cas.

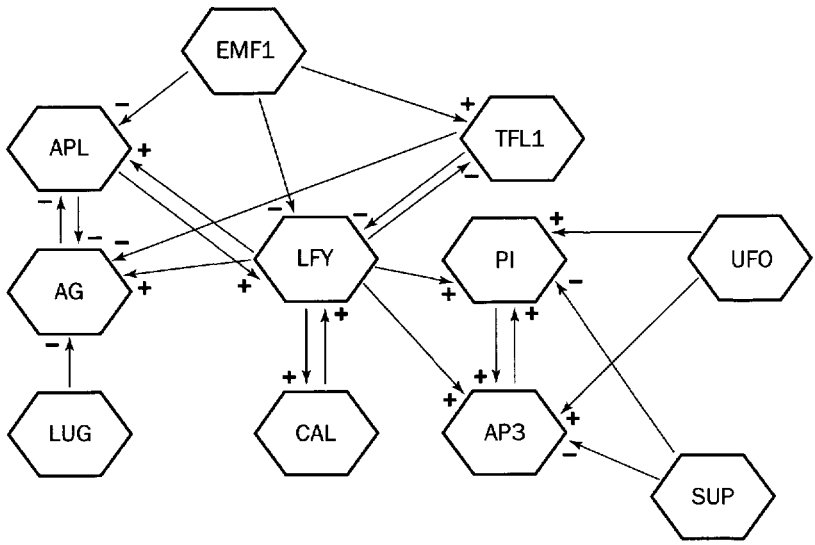


Figure AII-2.1 - Réseau de régulation de l'opéron de floraison d'*Arabidopsis thaliana* avec l'acronyme des différents gènes impliqués

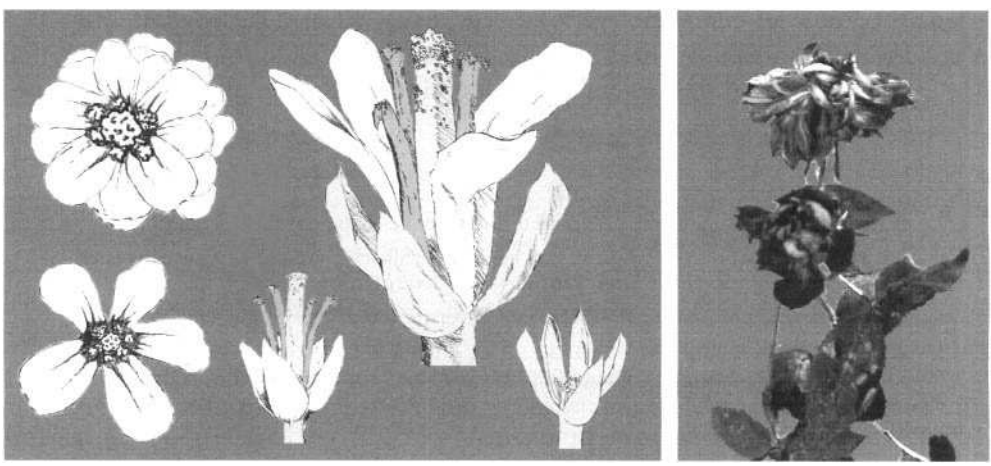


Figure AII-2.2 - Feurs d'*Arabidopsis* présentant un nombre variable de tissus (à gauche) **et fleur de rose prolifère de GOETHE** (à droite)

Chapitre III

CROISSANCE ET MULTIPLICATION CELLULAIRE

Didier GRUNWALD - Xavier RONOT

L'apparition d'une nouvelle discipline scientifique, la cinétique cellulaire, a permis un développement important des études de prolifération cellulaire, auparavant limitées au dénombrement des cellules. La cinétique cellulaire recouvre l'étude de la dynamique de division cellulaire et celle des évènements biochimiques et moléculaires qui la contrôlent.

Plusieurs étapes marquent son développement :

- ✓ en 1948, la mise en évidence, par BOIVIN et VENDRELY, d'une phase prémitotique et postmitotique,
- ✓ en 1953, la localisation, par HOWARD et PELC, de la synthèse d'ADN pendant l'**interphase**, et la subdivision du cycle cellulaire en différentes phases : G1, S, G2 et M. Bien que cette subdivision s'avère de plus en plus arbitraire, elle a toutefois permis une amélioration importante de la connaissance du rythme prolifératif des cellules,
- ✓ en 1957, l'introduction par QUASTLER et SHERMAN de la première méthode d'étude quantitative du cycle cellulaire, fondée sur l'incorporation d'une base radioactive, la thymidine tritiée, dans l'ADN pendant la phase S et l'étude de son évolution au cours du temps. Malgré ses limites, cette méthode figure encore aujourd'hui parmi les méthodes de référence.

D'autres techniques sont ensuite apparues, utilisées en association avec le marquage radioactif de l'ADN : la synchronisation cellulaire (l'ensemble des cellules d'une population se situe dans la même phase du cycle), la micro-cinématographie ou la cytophotométrie.

- ✓ En 1965, le début du développement de la cytométrie en flux, née des premiers essais de numération cellulaire automatisée décrits par MOLDAVAN en 1934, marqua un changement d'orientation important dans les techniques de cinétique cellulaire, en substituant le marquage radioactif de l'ADN par un marquage fluorescent. La cytométrie en flux permet d'analyser les cellules individuellement en mesurant la **fluorescence** émise par chacune d'entre elles. En règle générale, la distribution d'un constituant cellulaire peut être analysée par cytométrie en flux à condition qu'un colorant fluorescent se lie de manière

proportionnelle à ce constituant, et en quantité suffisante pour être détecté. Plusieurs innovations ont ensuite permis la mise au point des premiers cytomètres à flux, notamment l'adaptation d'un système d'injection de l'échantillon dans un flux laminaire par CROSLAND-TAYLOR. Un pas important a été ensuite franchi par l'introduction de technologies nouvelles dans les cytomètres à flux : mise en place des systèmes photodétecteurs par PARKER, mesure simultanée de plusieurs paramètres sur une même cellule par KAMENTSKY en 1965.

- ✓ En 1969, VAN DILLA sera le précurseur des cytomètres à flux actuels en associant le système d'entraînement des cellules par focalisation hydrodynamique, à une source lumineuse cohérente et unidirectionnelle fournie par un laser. VAN DILLA innove également dans les mesures d'ADN par fluorescence, puisqu'il est le premier à démontrer une relation linéaire entre le contenu en ADN et l'intensité de fluorescence fournie par des cellules dont l'ADN est coloré par le réactif de SCHIFF. Il fait ainsi progresser les études du cycle cellulaire par l'obtention d'histogrammes de distribution de l'ADN définissant clairement les phases G1, S et G2 et M du cycle cellulaire (figure 1). Depuis, l'évolution technologique rapide de la cytométrie en flux a transformé les prototypes des premiers analyseurs en véritables instruments de laboratoire dévolus à l'analyse automatisée de populations cellulaires. De nombreuses applications sont concernées par ce type d'analyse et plus particulièrement, la détermination du contenu en acides nucléiques, en relation avec la cinétique cellulaire.
- ✓ Dans ce domaine, les premières études d'actions d'agents pharmacologiques ont été réalisées par GOHDE en 1970, avec l'utilisation des mesures de teneurs en ADN pour déterminer des perturbations du cycle cellulaire. GOHDE avait pressenti les qualités de rapidité, souplesse et précision d'analyse de la cytométrie en flux dans le domaine de la cinétique cellulaire.

1. LE CYCLE CELLULAIRE : UNE DIVISION QUI MULTIPLIE

Depuis l'apparition de l'ADN et de son véhicule, la cellule, la vie a proliféré et envahi la planète grâce à un mécanisme conceptuellement simple : l'autoréplication. Le principe étant qu'une cellule, dite mère, se divise en deux cellules dites filles, globalement identiques à la cellule initiale, et autrement dit, capables à leur tour d'être à l'origine chacune, de deux autres cellules... Quand on connaît la puissance exponentielle qui se cache derrière une fonction telle que $N = 2^n$, on comprend aisément comment la vie, une fois apparue, a pu se répandre et s'installer de manière aussi large et importante.

Le mécanisme par lequel une cellule initiale est capable de donner deux cellules identiques à elle-même et entre elles est appelé division cellulaire.

La division cellulaire comporte la division des chromosomes (ou **mitose**) et la division du cytoplasme, appelée **cytodiérèse** (ou cytocinèse).

Une cellule, quelle qu'elle soit, se caractérise essentiellement par son matériel génétique, c'est-à-dire son contenu en ADN (voir chapitre II), et ce, aussi bien qualitativement (séquence) que quantitativement. Par conséquent, pour que les cellules filles soient identiques à la cellule mère, il est nécessaire que celle-ci double son contenu en ADN préalablement à sa division [1]. Au cours de cette étape particulière de la vie cellulaire, appelée phase de réplication ou de synthèse, la cellule réalise une copie exacte de son matériel génétique, bénéficiant pour ce faire de la structure antiparallèle de l'ADN (voir chapitre II). Autour de cette phase de synthèse (S), le cycle cellulaire s'organise en différentes phases successives (figure 1).

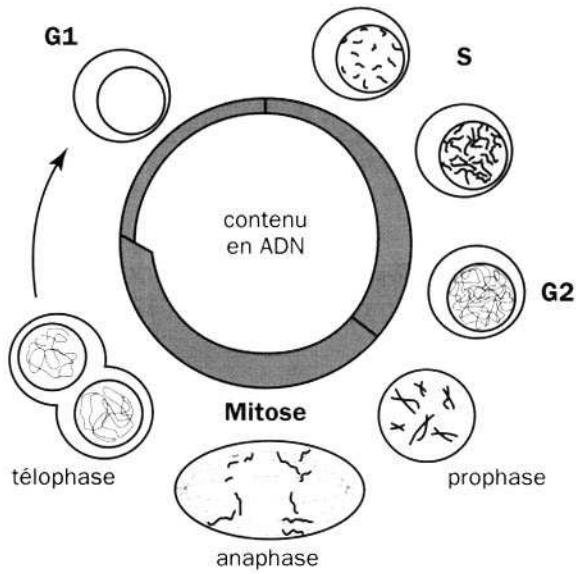


Figure 1 - Progression des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire

La phase G1 (quantité d'ADN = 2n) précède la phase S et la phase G2 (quantité d'ADN = 4n) qui lui succède. Cette dernière est immédiatement suivie par la phase M (pour mitose) qui correspond à la division cellulaire proprement dite, et dont vont résulter deux cellules. La phase M elle-même est subdivisée en plusieurs étapes morphologiquement distinctes : la prophase, la métaphase, l'anaphase, et la télophase (figure 1). Au cours de la prophase, l'ADN est condensé puis réparti en deux entités identiques au cours de la métaphase.

1. Il est clair que l'ensemble de la machinerie cytoplasmique subit également un certain niveau d'amplification, afin de pouvoir fournir aux deux cellules filles les outils nécessaires à leur fonctionnement, en quantité suffisante; par souci de simplification, nous nous intéresserons essentiellement aux phénomènes concernant le matériel génétique.

Un processus mécanique actif, appelé clivage ou segmentation, se produit au cours de la division des cellules animales. Initié dès l'anaphase, le clivage se poursuit en télophase et se termine au début de l'**interphase**. Il se situe perpendiculairement à l'axe longitudinal d'une structure intracellulaire particulière, le fuseau mitotique, constitué d'un ensemble de microtubules qui se rejoignent en deux pôles cellulaires, les **centrosomes**. Le clivage se produit dans un plan de section du fuseau, appelé plaque équatoriale, qui détermine la position du sillon de clivage en association avec différents processus de régulation [2]. Cette segmentation du cytoplasme est due à l'action mécanique d'un anneau contractile, ancré à la membrane plasmique et constitué de 20 filaments d'actine disposés circulairement et associés à des filaments de myosine. La contraction de l'anneau se produit par déplacement relatif de l'actine et de la myosine, selon un processus identique à celui existant dans les cellules musculaires. La membrane plasmique est entraînée par la contraction, ce qui provoque l'étranglement du cytoplasme.

Au cours de la segmentation, les microtubules issus des deux pôles du fuseau de microtubules sont resserrés au centre de la cellule. Seul un pont cytoplasmique relie les deux cellules filles (corps intermédiaire). La rupture de ce corps intermédiaire marque la fin de la division cellulaire.

2. *DE LA QUANTITÉ À LA COMPLEXITÉ : LA PROLIFÉRATION ORGANISÉE*

2.1. PROCARYOTES VERSUS EUCARYOTES

Les premiers « véhicules » à ADN ont été des **procaryotes**, équivalents de nos bactéries actuelles : dépourvus de noyaux, constitués d'un court brin d'ADN circulaire entouré d'une membrane plasmique (voir chapitre I). A ce niveau d'évolution, la division cellulaire se limite à un phénomène purement prolifératif. L'individualité est maintenue et les copies sont presque toujours parfaitement fidèles à l'original. Seules les mutations naturelles induites par l'environnement et une sexualité primitive, exceptionnelle et également conditionnée par l'environnement, autorisent une légère variabilité, dont les possibilités d'évolution restent très limitées.

C'est avec l'apparition de la cellule **eucaryote** que la multiplication cellulaire s'est trouvée impliquée dans l'évolution. La duplication n'est plus le but unique : le cycle cellulaire s'inscrit comme une fonction, essentielle mais parmi d'autres, au sein d'une organisation relativement complexe. Les cellules n'assurent pas seulement leur survie par la fuite en avant perpétuelle de la multiplication, mais

2. L'aspect auto-organisé de ce processus a fait l'objet d'une étude récente de H. MEINHARDT & P.A. DE BOER, Pattern formation in Escherichia coli: a model for the pole-to-pole oscillations of Min proteins and the localization of the division site. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**(25), 14202-7 (2001).

également en interagissant avec l'environnement et en s'y adaptant grâce aux diverses machineries cytoplasmiques dont elles se sont dotées (voir chapitre I).

La première conséquence de cette élévation vers la complexité est une différence dans la cinétique du cycle cellulaire. Chez les procaryotes, du fait de leur simplicité, la durée moyenne d'un cycle cellulaire est de 20 minutes. Chez les eucaryotes, la durée, variable d'un type cellulaire à l'autre, est de 10 à 20 heures environ. Ainsi, pendant qu'une cellule eucaryote réalise 1 division, une cellule procaryote est capable de produire 2^{30} ($\cong 10^9$) copies d'elle-même ! (figure 2).

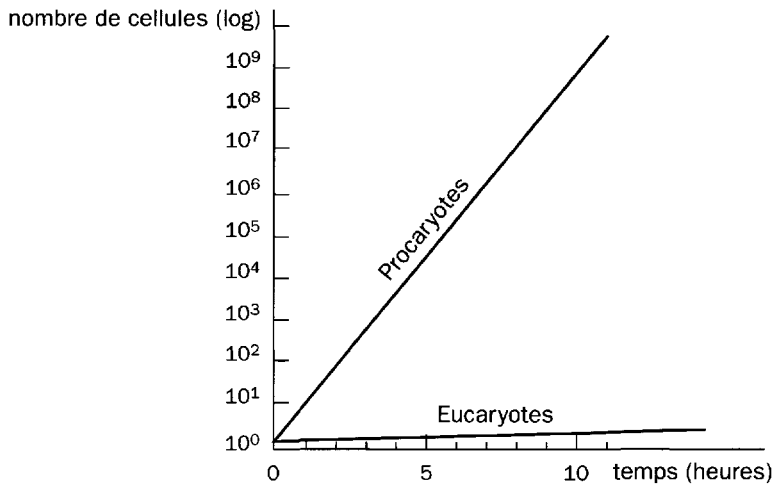


Figure 2 - Comparaison des courbes de croissance des procaryotes et des eucaryotes

2.2. LES ORGANISMES PLURICELLULAIRES : CYCLE ET DÉVELOPPEMENT

Le deuxième point qui caractérise les eucaryotes est l'apparition d'êtres pluricellulaires : les cellules se divisent et prolifèrent, mais restent regroupées pour participer à l'élaboration d'un organisme. On parle alors de développement (voir chapitre IV). A ce stade, il semble difficile de parler de la poule sans se préoccuper de l'oeuf, et si on s'intéresse à l'oeuf, une certaine connaissance de la poule est nécessaire. Pour simplifier, et tenter de se libérer de ce paradoxe, disons que la construction d'un organisme débute par la fécondation d'un oeuf, par un spermatozoïde. L'oeuf fécondé, appelé **zygote**, est alors une cellule diploïde [3] qui va pouvoir commencer à se diviser selon le principe du cycle cellulaire : 2, 4, 8, 16... 2^n cellules, jusqu'à donner un nouvel organisme, capable à son tour de fabriquer des **cellules germinales** (oeufs et spermatozoïdes), qui elles-mêmes... Le premier fait marquant dans cette succession d'événements, est que le cycle cellulaire n'est pas uniquement multiplicatif. Même si chaque division donne,

3. La quantité d'ADN Q = 2n, par opposition au gamètes dits haploïdes où Q = 1n.

globalement, deux cellules filles identiques entre elles et à la cellule initiale, il est clair que le résultat final ne se présente pas simplement sous la forme d'un paquet informe de cellules. Au cours du développement, progressivement, des formes, des structures se mettent en place (voir chapitre IV) pour finalement aboutir à une architecture organique et tissulaire élaborée, capable de réaliser les fonctions les plus complexes : boire, manger, voir, entendre, marcher, voler... et parfois même penser.

Il ressort d'une telle constatation que, au-delà de son aspect prolifératif, essentiel pour atteindre une sorte de masse critique, le cycle cellulaire doit participer au destin des cellules. C'est l'aspect différenciateur du cycle. Au vu des résultats, cette différenciation ne se fait pas au hasard. Elle est le fruit d'un conditionnement multifactoriel, dans lequel intervient aussi bien le nombre de cellules, que leur position relative, leurs relations avec le milieu extérieur (voir chapitre V), ou, plus simplement, la force de gravité (voir annexe 1 du chapitre V). C'est en prenant en compte toutes ces informations, à chaque nouveau cycle, que les cellules vont finalement être en mesure d'effectuer, correctement et au bon endroit (voir chapitre IV) une tâche spéciale nécessaire au bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme.

2.3. LA DIFFÉRENCIATION : DE LA PLURIPOTENCE À LA FONCTION UNIQUE

Le premier résultat de la fécondation est la constitution d'un nouveau **génome**, unique, dans lequel se trouvent toutes les informations nécessaires à la fabrication, au fonctionnement, à l'entretien et aux réparations d'un nouvel organisme (voir chapitre II). Au fur et à mesure des divisions, chaque cellule conserve la totalité de ce plan. Par ailleurs, alors que l'organisme se construit progressivement, les cellules, en fonction de leur situation, voient leur destin s'orienter dans une direction particulière, et plus le développement avance, plus la direction se précise.

Les cellules issues des premières divisions sont appelées **blastomères** et peuvent être considérées comme équivalentes, voire interchangeables. En réalité, très rapidement des phénomènes de ségrégation cytoplasmique orientent le destin des blastomères. Puis, le nombre de cellules augmentant, des replis, des structures se dessinent. On parle de **territoires présomptifs**, qui se répartissent, de l'extérieur vers l'intérieur, en **ectoderme**, **mésoderme** et **endoderme** (voir chapitre V). Chacune de ces régions va être à l'origine de tissus ou d'organes particuliers. Dès lors, il apparaît qu'une cellule appartenant au mésoderme par exemple, perd les potentialités correspondant au devenir de l'ectoderme ou de l'endoderme (voir chapitre IV), et ce bien que le génome soit représenté dans son intégralité dans toutes les cellules de tous les tissus. La **différenciation** peut être considérée comme une réduction progressive des potentialités de destin des cellules. Parrallèlement, les conditions nécessaires à la réalisation de fonctions spécifiques se mettent en place de cycle en cycle par l'expression de gènes particuliers. Après un certain nombre de cycles, lorsque la cellule est définitivement apte à réaliser ses

fonctions, elle cesse de se diviser (voir chapitre II, § 6). De cette manière, lorsqu'une cellule est arrivée au terme de sa différenciation, seuls les gènes nécessaires à son métabolisme général et à la réalisation de sa fonction particulière, restent encore activés. L'ADN des eucaryotes, au lieu d'être nu comme celui des procaryotes, est pris dans une structure protéique constituée en particulier d'**histones**, l'ensemble formant la chromatine (voir chapitre II, § 3). Les histones semblent jouer un rôle essentiel dans le mécanisme répressif décrit, fondamental pour un fonctionnement cohérent et harmonieux de l'ensemble de l'organisme.

3. PROBLÈMES ET LIMITES DU CYCLE CELLULAIRE

3.1. PROBLÈMES

L'un des premiers problèmes rencontrés par les cellules concerne le maintien de l'intégrité du génome. Suite aux agressions du milieu extérieur, et en particulier des agents mutagènes tels que produits chimiques ou radiations, des modifications peuvent apparaître dans l'ordonnancement des bases, des sortes de fautes d'orthographe qui, si elles concernent un gène, peuvent induire son dysfonctionnement et avoir des conséquences dramatiques pour la cellule (voir chapitre II, § 8). Ces accidents, lorsqu'ils surviennent pendant l'**interphase** entraînent généralement la mort de la cellule, mais restent sans conséquence notable pour l'organisme. Par contre, si une cellule dont l'ADN a subi des lésions ou des remaniements entame un cycle de division, en particulier si les mutations concernent des gènes impliqués dans la régulation du cycle, l'absence de corrections peut mener à une transformation débouchant sur une lignée anormale dont le développement incontrôlé peut être fatal pour l'organisme dans sa totalité.

Une autre source d'erreur dans la séquence génomique, se situe au niveau du mécanisme de réplication proprement dit (voir chapitre II, § 7). Si on assimile chaque paire de bases à un simple caractère d'imprimerie, le total du génome humain représente plus d'un million de pages ! On comprend dans ces conditions que les possibilités d'erreur de recopie ne manquent pas.

Pour éviter ce genre d'accident, les cellules disposent d'un certain nombre d'enzymes chargées de corriger les erreurs, détectables grâce à la structure antiparallèle de l'ADN (voir chapitre II, § 6). Cependant il peut arriver que, suite à des remaniements trop importants, la cellule ne soit pas en mesure d'effectuer toutes les corrections nécessaires. Dans ce cas, certaines **protéines**, considérées parfois comme « gardiennes du génome », ont pour rôle d'empêcher la cellule de proliférer, soit en induisant un blocage en phase G0/1, soit plus brutalement en programmant sa mort (**apoptose**) [STELLER, 1995 ; SÉGAL-BENDIRDJIAN, 1999].

Un autre point crucial de la division cellulaire, concerne le passage de G2 en **mitose**. En effet, il est nécessaire, une fois la réplication réalisée, d'y mettre un

terme afin d'éviter une hyperploïdie (la quantité d'ADN est supérieure à la normale), source inévitable de dérèglement cellulaire. Pour éviter cela, la cellule forme un complexe protéique appelé MPF (pour *Mitosis Promoting Factor*), qui la protège du risque d'hyperploïdie en l'obligeant à rentrer en mitose.

3.2. LIMITES

A l'extrémité des chromosomes eucaryotes, on trouve un complexe nucléoprotéique dénommé **télomère**, impliqué entre autres dans la répartition équitable des chromosomes dans les deux cellules filles. Par ailleurs, les télomères ne sont pas répliqués complètement par les enzymes conventionnelles utilisées par la cellule au cours de la phase S. Leur réplication totale n'est assurée que par une enzyme particulière, la télomérase. Or, cette enzyme n'est pas exprimée dans les **cellules somatiques**. La conséquence est un raccourcissement progressif des télomères à chaque division cellulaire, qui constituerait une sorte d'horloge biologique, et expliquerait que le nombre de divisions possibles à partir du moment de la fécondation soit limité à une cinquantaine. Ainsi, la mort de l'individu semblerait en relation avec l'usure des télomères. Seules les cellules de la lignée germinale montrent une activité télomérase, assurant ainsi à la descendance potentielle une remise à zéro de l'horloge biologique. Dans les cellules somatiques, lorsque la télomérase s'exprime, un phénotype cancéreux lui est associé.

Tous les systèmes de contrôle du cycle dont disposent les cellules peuvent malheureusement être pris en défaut. Les conséquences des dérèglements qui s'en suivent, souvent graves, parfois fatales, ont poussé les chercheurs à étudier de plus en plus précisément les nombreux mécanismes mis en jeu lors de la division cellulaire.

4. MÉTHODES D'ÉTUDE DU CYCLE CELLULAIRE

Différentes méthodes ont été développées pour étudier le cycle cellulaire : incorporation de thymidine tritiée pour l'évaluation de la prolifération, microcinématographie pour l'aspect morphocinétique du cycle, et en particulier de la mitose, analyse d'image... Cependant, la technique la plus employée aujourd'hui est sans conteste la cytométrie en flux (CMF).

Principes généraux de la cytométrie en flux

Malgré son relatif jeune âge (les premiers prototypes datent de 1965, et son apparition en France du début des années 1980), la cytométrie en flux est devenue une technique de routine, utilisée aussi bien dans le domaine de la recherche fondamentale que dans le cadre d'applications cliniques.

Le principe de la cytométrie en flux (figure 3) repose sur l'association de technologies mettant en œuvre différents principes physiques ou physico-chimiques, et à

partir desquelles il est possible d'analyser individuellement et rapidement les divers éléments d'une population cellulaire (ou sub-cellulaire), en fonction de plusieurs paramètres. Les résultats alors fournis se présentent sous la forme d'une représentation statistique de la répartition de la population selon les critères étudiés.

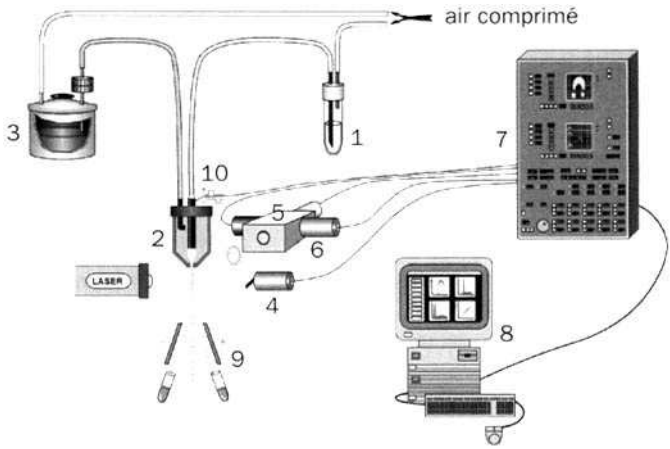


Figure 3 - Schéma de principe d'un cytomètre à flux

L'échantillon (1) subit une focalisation hydrodynamique (2) au moyen d'un liquide d'entraînement (3). Les signaux de diffusion sont recueillis par une photodiode (4) et les signaux de fluorescence sont sélectionnés par des filtres optiques (5) et collectés par des photomultiplicateurs (6). Un analyseur multicanaux (7) et un micro-ordinateur (8) permettent de gérer leur acquisition et analyse. Le tri des cellules est réalisé au moyen de plaques de déviation (9) après chargement électrostatique du jet (10) fractionné en gouttelettes (figure 3).

Le défilement rapide de particules individualisées est réalisé selon le principe de la focalisation hydrodynamique [4]. L'analyse proprement dite est effectuée par la mesure de signaux optiques : les cellules une fois alignées et accélérées (1000 à 5000 par seconde) passent devant un faisceau de lumière d'excitation, fourni par un laser ou une lampe à vapeur de mercure. De l'interaction entre le faisceau et les particules résultent des signaux lumineux de plusieurs natures :

- ✓ la diffusion aux petits angles, collectée dans l'axe du faisceau excitateur, donne une indication sur la taille des cellules,
- ✓ la diffusion grands angles, collectée à 90° par rapport au faisceau lumineux, donne des indications sur la structure interne (granulométrie, rapport nucléo-cytoplasmique...),
- ✓ la fluorescence, celle-ci pouvant être une auto-fluorescence, ou résulter d'un marquage ; d'une longueur d'onde différente de celle de l'excitation, sa collection nécessite l'utilisation de filtres optiques spécifiques.

4. La focalisation hydrodynamique permet aux cellules d'être centrées dans une gaine liquide.

Collectés et amplifiés par des photodétecteurs, les signaux lumineux sont transformés en signaux électriques et leur amplitude est ajustée électroniquement pour être compatible avec la plage de travail de l'analyseur multicanaux vers lequel ils sont dirigés. Au fur et à mesure de leur apparition, les signaux sont classés en fonction de leur hauteur, et participent ainsi à la constitution d'un histogramme de la répartition des cellules en fonction du (des) paramètre(s) étudié(s).

Au-delà de sa fonction analytique, la CMF permet le tri de sous-populations particulières mises en évidence par l'analyse. La réalisation de cette opération passe par :

- ✓ la définition à l'aide de curseurs, des zones correspondant aux sous-populations à trier (1 à 2),
- ✓ le fractionnement du jet en gouttelettes,
- ✓ le chargement électrostatique des gouttelettes contenant un objet appartenant aux zones définies,
- ✓ la déviation par un champ électrique des gouttelettes chargées, et leur récupération dans des tubes.

Les cellules ou particules subcellulaires ainsi triées pourront alors faire l'objet d'études aussi bien structurales que biochimiques, ou encore être analysées en biologie moléculaire, ou même être remises en culture dans le cas d'un travail sur cellules vivantes [RONOT & SCHOËVAËRT, 1999].

5. *APPLICATION DE LA CMF À L'ÉTUDE DU CYCLE CELLULAIRE*

La cytométrie en flux permet d'obtenir une analyse globale des différents paramètres du cycle cellulaire. La progression des cellules dans le cycle se caractérise en premier lieu par une modification de leur contenu en ADN. Ainsi, la quantité d'ADN de chaque cellule détermine sa position dans le cycle et en analysant un nombre statistiquement satisfaisant de cellules, il est possible d'estimer le pourcentage de cellules dans chacune des phases.

5.1. ANALYSE MONOPARAMÉTRÉE

Il existe un certain nombre de **fluorochromes** spécifiques de l'ADN, grâce auxquels le contenu cellulaire peut être étudié. Les fluorochromes les plus employés sont l'**I**odure de **P**ropidium (IP), et le **B**romure d'**éth**idium (**Bet**). Ces colorants présentent l'avantage d'être excités par l'une des principales longueurs d'onde des lasers argon (488 nm), et émettent autour de 620 nm avec un très bon **rendement quantique**. Leur inconvénient est qu'ils ne sont pas, à proprement parler, spécifiques de l'ADN, mais plus exactement des **polynucléotides** double brins. Autrement dit, ils sont également capables de se fixer à l'intérieur de doubles brins ARN-ARN, ou d'hybrides ADN-ARN. En conséquence, leur emploi, si l'on

souhaite effectuer une mesure précise de l'ADN, et rien que de l'ADN, nécessite un traitement par la RNase.

Les deux autres fluorochromes classiquement utilisés dans l'analyse du cycle cellulaire, sont le **HO**echst (HO) 33258 et le **DiA**mino**P**henyl**I**ndol (DAPI). Spécifiques de l'ADN, ces colorants ont l'inconvénient de nécessiter une excitation par des longueurs d'onde U.V. disponibles uniquement sur les gros lasers argon (chers...). Leur émission se situe autour de 450 nm. On notera par ailleurs que le PI, le Bet et le DAPI, incapables de franchir la membrane cellulaire, nécessitent une fixation préalable des cellules. Le Hoechst 33342 est capable de colorer des cellules vivantes. L'analyse en flux de cellules colorées par ces divers fluorochromes révèle un histogramme dont la forme typique est donnée sur la figure 4.

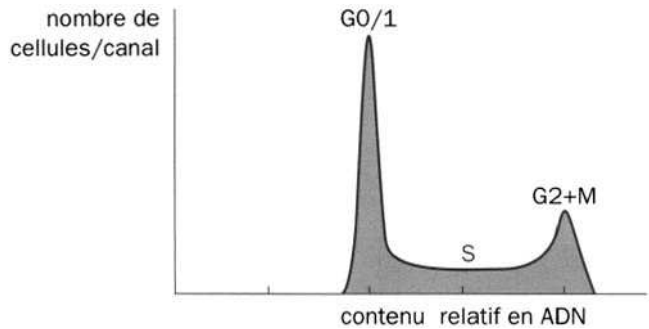


Figure 4 - Analyse monoparamétrée du cycle cellulaire
L'histogramme met en évidence une première population (cellules en G0/1), une seconde population avec un contenu en ADN double (cellules en G2+M) et une population intermédiaire correspondant aux cellules en cours de réplication (phase S).

5.1.1. Etude de la prolifération

Le pic de plus faible fluorescence correspond aux cellules en G0/1, le pic de plus forte fluorescence, double du premier pic, correspond aux cellules en G2+M, et la zone intermédiaire aux cellules en phase S (figure 4). Pour déterminer le pourcentage correspondant à chacune des phases, des logiciels informatiques sont capables d'effectuer une déconvolution de l'histogramme en différentes composantes mathématiques. Les phases G0/1 et G2+M sont assimilées à une gaussienne, tandis que la phase S, suivant les programmes, est estimée par une simple différence (**a**), un polynôme du second degré (**c**), voire une somme de gaussiennes (**b**) (voir encadré).

a La méthode miroir considère que la moitié gauche du pic G0/1 ne contient que des cellules en G0/1 et que la moitié droite du pic G2+M ne contient que des cellules dans ces phases. En multipliant par 2 le nombre de cellules comptabilisées dans chacun des demi-pics, on obtient le nombre de cellules en G0/1 et G2+M respectivement. Le nombre de cellules en phase S est obtenu simplement en soustrayant le contenu des phases G0/1 et G2, M au total.

Analyse mathématique du cycle cellulaire

La figure 5 illustre différents traitements mathématiques possibles de l'histogramme exprimant le contenu relatif en ADN d'une population cellulaire.

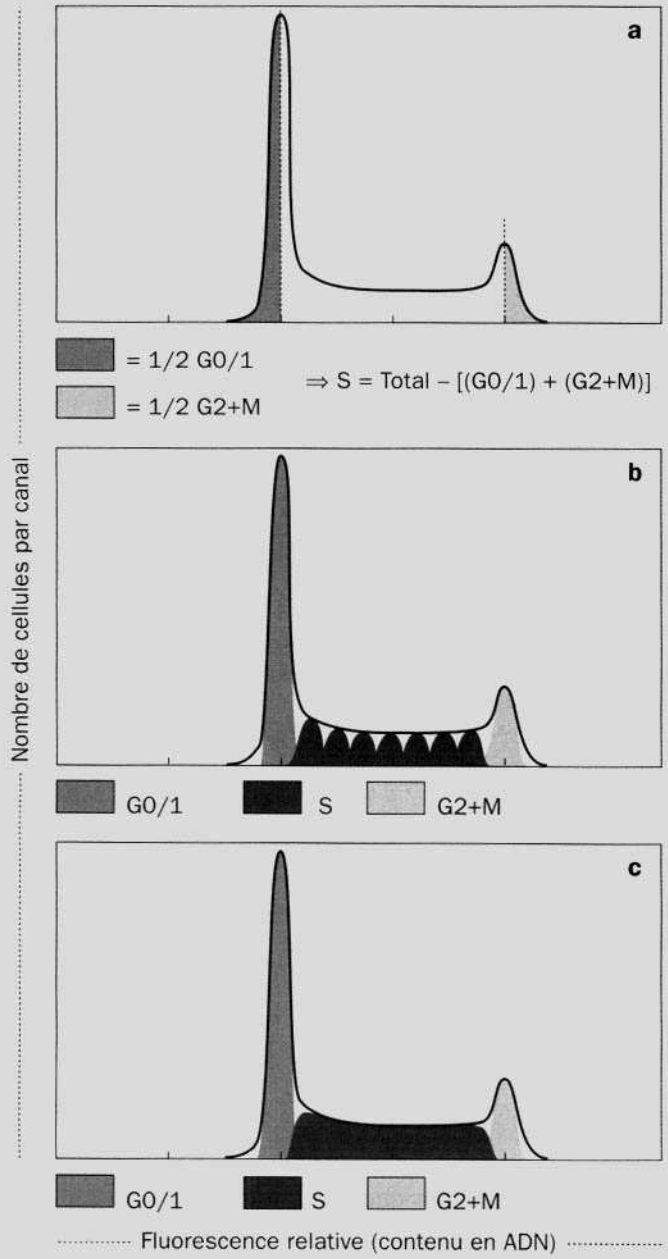


Figure 5 - Analyse de l'histogramme exprimant le contenu relatif en ADN d'une population de cellules I

b - c Les méthodes des gaussiennes (**b**) et du polynôme du second degré (**c**) assimilent chacune les phase G0/1 et G2+M a des gaussiennes. Elles se différencient par leur méthode d'évaluation de la phase S. Dans un cas (**b**), la phase S est assimilée a une somme de gaussiennes, alors que dans l'autre cas (**c**), cette phase est estimée par un polygone du second degré.

La conséquence est que, suivant le programme utilisé, il est possible à partir d'un même histogramme d'obtenir des résultats sensiblement différents. La limite de ce type d'analyse, en partie à l'origine de ces divergences, se trouve dans l'impossibilité de faire la différence entre une cellule en phase G1 et une cellule en phase S précoce et, à l'autre extrémité du spectre, entre une cellule en S tardif et une cellule en G2. Ces résultats, malgré leurs limites, constituent une source d'informations essentielles, aussi bien dans les études fondamentales concernant les mécanismes de fonctionnement et de régulation du cycle cellulaire que dans des approches cliniques, diagnostiques et pronostiques ou dans le suivi thérapeutique des patients.

5.1.2. Mesure de la ploïdie (index en ADN)

La mesure de la **ploïdie** constitue un indice à la fois diagnostique et pronostique quant à la nature normale ou tumorale des cellules. Il est possible par CMF de mesurer le degré de ploïdie des cellules analysées. En prenant comme référence le pic correspondant à des cellules normales en G0/1, de ploïdie 2 par définition, on peut calculer l'index d'ADN relatif d'une population aneuploïde.

Les modifications de ploïdie qui apparaissent fréquemment lors du développement de phénomènes tumoraux sont clairement mises en évidence par une analyse en flux du contenu en ADN des cellules incriminées. Les cellules tétraploïdes en G1 apparaissent au niveau du pic G2 des cellules normales proliférantes, tandis que les cellules G1 hypo-tétraploïdes forment un pic situé entre les pics G1 et G2 normaux (figure 6).

En mesurant le contenu en ADN, il est possible de metttre en évidence les modifications de ploïdie qui apparaissent fréquemment lors du développement de phénotypes tumoraux. Normalement, les cellules de l'organisme sont pour l'essentiel en phase G0/1 (graphe supérieur). Aussi, la mise en évidence de cellules en S et G2+M (ligne 2) peut être l'indice d'une prolifération tumorale. D'autre part, suite à la mise en place d'une prolifération anormale, il peut arriver que certaines cellules arrivées en G2 (ADN = 4n) n'effectuent pas leur **mitose**. En reprennant alors un cycle de synthèse, les cellules donnent des cellules en G2+M ayant un contenu en ADN = 8n (ligne 3). Dans ce cas, le pronostique devient moins favorable. Enfin, la machinerie cellulaire n'étant pas conçue pour traiter autant de matériel génétique, il arrive parfois qu'une partie de ce matériel ne soit pas répliqué. Les cellules en G1 deviennent alors hypotetraploides (ADN < 4n), et le pronostique encore moins favorable (ligne 4).

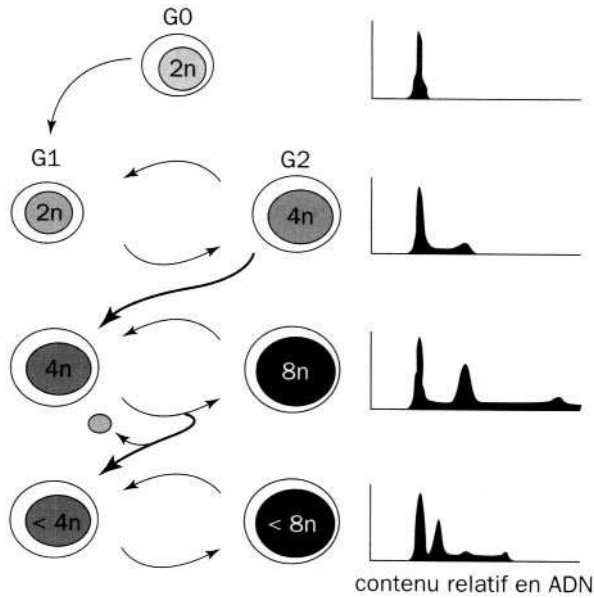


Figure 6 - Approche des phénomènes tumoraux par mesure du contenu en ADN

Il est également possible d'obtenir une valeur absolue de la quantité d'ADN de cellules, en les analysant simultanément avec des cellules de référence, au contenu en ADN parfaitement connu. Les standards classiques sont les érythrocytes de poulet, et les érythrocytes de truite.

5.2. ANALYSE MULTIPARAMÉTRÉE

5.2.1. Marquage des cellules en phase S par incorporation de BrdU

Comme signalé précédemment, une des limites de l'analyse mono paramétrée est l'impossibilité de différencier les cellules en début et en fin de phase S, des cellules en G0/1 et G2+M respectivement. L'utilisation de BrdU (**B**romod**é**oxy**U**ridine) a permis de résoudre ce problème, grâce à son analogie avec la thymine et à ses qualités antigéniques. Si l'on met des cellules proliférantes en présence de BrdU, pendant une courte période (15 à 30 mn) avant de les fixer, seules les cellules en cours de réplication vont être capables de l'incorporer. Après fixation, les cellules sont soumises à un traitement destiné à rendre le BrdU accessible, puis mises en présence d'un **anticorps** dirigé contre ce composé. Dans un deuxième temps, ce premier anticorps est révélé à l'aide d'un second anticorps marqué par un fluorochrome, généralement le FITC (**F**luoresc**é**ine**I**so**T**hio**C**yanate). La dernière étape consiste à marquer globalement l'ADN à l'aide d'un fluorochrome spécifique, comme pour l'analyse monoparamétrée.

L'analyse en flux est ensuite réalisée à l'aide d'un seul laser, si le fluorochrome colorant l'ADN est l'IP ou le Bet : ils ont la même longueur d'onde d'excitation

(488 nm) que le FITC, et une longueur d'émission différente (530 nm pour le FITC, 620 nm pour l'IP ou le Bet). La coloration de l'ADN par le HO ou le DAPI nécessite une analyse en double laser.

Le résultat se présente sous la forme d'un histogramme biparamétré, donnant en abscisse le contenu global en ADN et en ordonnée la quantité de BrdU incorporée (figure 7). Dans ces conditions, le calcul du pourcentage de cellules dans chacune des phases devient simple et sans ambiguïté [YONISH-ROUACH *et al.*, 1993].

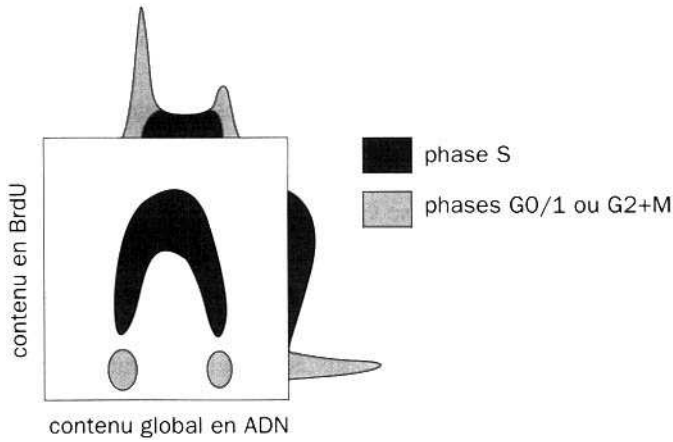


Figure 7 - Analyse en flux du cycle cellulaire, après incorporation de BrdU et immunomarquage fluorescent

5.2.2. Mesure de la durée du cycle

Les propriétés du BrdU peuvent être également utilisées pour estimer de manière plus fine la durée de chacune des phases du cycle cellulaire, par la technique dite de pulse-chase, dont le principe est le suivant. Après avoir mis les cellules en présence de BrdU pendant un temps court (*pulse*), on effectue un changement de milieu (*chase*), et on remet les cellules en culture dans du milieu normal. En réalisant, à intervalles de temps réguliers, l'analyse d'un aliquote des cellules, il est possible de suivre le devenir des cellules qui étaient en cours de réplication au moment du marquage. Celles-ci vont passer en G2+M, puis en G0/1... et pourront être repérées grâce à la quantité de BrdU incorporée, celle-ci étant bien entendu réduite de moitié à chaque **mitose**. On obtient ainsi une cinétique précise et une mesure temporelle absolue du cycle cellulaire.

Il convient cependant de savoir que ce type d'expérience, apparemment simple dans son principe, n'est pas trivial à réaliser, et nécessite pour trouver tout son sens des traitements informatiques relativement complexes [GRAY *et al.*, 1990].

Une manière moins sophistiquée d'obtenir des informations à peu près équivalentes consiste à combiner les pourcentages de phases obtenus classiquement à une mesure du **temps de doublement** des cellules. Cette dernière correspond globalement à la durée totale du cycle, qu'il suffit de rapporter ensuite aux pourcentages,

pour obtenir une valeur absolue du temps passé par les cellules dans chacune des phases. Typiquement, pour un temps de doublement de 15 heures, on observe une répartition des pourcentages de phases de : G0/1 = 50% (soit 7h30), S = 30% (soit 4h30), G2+M = 20% (soit 3h).

5.2.3. Cycle cellulaire et contenu en ARN

Grâce aux propriétés de l'**A**cridine **O**range (AO), il est possible de mesurer simultanément le contenu en ADN et en ARN des cellules. La particularité de ce colorant, excitable à 488 nm, est de se fixer de manière différente sur les polynucléotides double ou simple brin, et d'émettre alors à des fluorescences de longueur d'onde différentes : vert (520 nm) pour les doubles brins, rouge (650 nm) pour les simples brins. En opérant dans les conditions adéquates, l'ADN est estimé par la fluorescence verte, tandis que l'ARN se mesure par la fluorescence rouge. Ainsi, les cellules quiescentes (phase G0) dont le contenu en ARN est plus réduit que celui des cellules en cycle, peuvent être séparées des cellules en phase G1.

De la même manière, dans un mélange de cellules normales et de cellules tumorales ayant le même degré de ploïdie, les secondes vont être séparées des premières, du fait de leur métabolisme plus actif qui se caractérise entre autres par une plus grande quantité d'ARN [DARZYNKIEWICZ & KAPUSCINSKI, 1990].

Au delà d'une mesure globale de l'ARN, la CMF permet également d'étudier le niveau d'expression d'un **ARN messager** (ARNm) particulier en fonction du cycle cellulaire. Dans ce but, on note essentiellement deux approches. La première consiste à marquer spécifiquement, *in situ*, l'ARNm auquel on s'intéresse à l'aide de **sondes** complémentaires, préalablement marquées par un fluorochrome. Le résultat se présente sous la forme d'un histogramme biparamétré, donnant en abscisse le contenu en ADN, et en ordonnée le contenu en l'ARNm étudié. Cette technique reste encore peu usitée, principalement en raison de la fragilité des ARN qui ont parfois le plus grand mal à survivre aux traitements nécessaires à l'**hybridation *in situ*** en suspension. D'autre part, seuls des ARN à fort taux d'expression (> 1000 copies/cellule) sont susceptibles d'être ainsi étudiés. De plus, cette technique ne permet pas de différencier l'ARNm intéressant de ses formes pré-messager ou des ARN d'un éventuel **pseudo-gène**.

Une alternative dans l'étude d'un ARNm spécifique en fonction du cycle cellulaire consiste, dans un premier temps, en une simple analyse du contenu en ADN, suivie d'un tri des cellules en fonction de leur position dans le cycle. En utilisant ensuite sur les cellules triées les techniques classiques de biologie moléculaire (extraction des ARN, **électrophorèse**, hybridation), on obtient des informations plus sûres et plus probantes [GRUNWALD *et al.*, 1995].

Lorsque l'on veut associer CMF et tri cellulaire, il est logique d'envisager immédiatement un tri réalisé par cytométrie en flux. Or, pour obtenir une quantité suffisante de matériel biologique, il faut compter plusieurs dizaines de millions de cellules. Aussi rapide que puisse être l'analyse et le tri par CMF, la durée du tri se

compte alors en heures. En combinant l'**élutriation** à la CMF, il est possible de résoudre ce problème de temps. En associant ces deux techniques, plusieurs dizaines de millions de cellules dans chacune des phases du cycle peuvent être triées en moins de deux heures, et être utilisées ensuite avec un certain « confort quantitatif », que ce soit en biologie moléculaire ou en biochimie. Cette approche peut également être utilisée pour la synchronisation de cellules, avec moins de perturbation du métabolisme cellulaire que lorsque les techniques de synchronisation sont basées sur la privation en sérum ou l'emploi de drogues.

5.2.4. Cycle cellulaire et contenu en protéines

Les possibilités d'analyse multiparamétrée offertes par la CMF, autorisent une étude simultanée du cycle cellulaire et du contenu en **protéines** spécifiques des cellules. Cette approche consiste en une mesure du contenu en ADN réalisée grâce aux fluorochromes précédemment décrits, associée à un marquage des protéines à l'aide d'anticorps spécifiques, fluorescents, ou révélés dans un deuxième temps par un second anticorps lui-même fluorescent. Il est possible d'appliquer cette technique aussi bien à des protéines membranaires (voir chapitre V) qu'à des protéines cytoplasmiques ou nucléaires. Les mesures globales ainsi réalisées peuvent être complétées par un tri sur lame de microscope, grâce auquel la localisation intracellulaire pourra être précisée [CAHEN *et al.*, 1994].

Cette caractérisation simultanée ADN/Protéine est également utilisée dans le cadre d'étude de la prolifération et des différentes composantes du cycle. En effet, certains antigènes, tel que le KI67, ont une expression liée aux potentialités de prolifération des cellules. Leur marquage à l'aide d'anticorps spécifiques permet de faire la différence entre cellules quiescentes (phase G0) et cellules proliférantes. Certaines **glycoprotéines** permettent de distinguer les cellules en première partie de phase G1 (G1-A), des cellules en G1 engagées dans le processus de division (G1-B). D'autres protéines, telles que les cyclines [PRESSCOTT, 1989], histones, ou **oncoprotéines**, dont l'expression varie au cours du cycle cellulaire, ont ainsi pu être étudiées ou utilisées en CMF, afin de comprendre la manière dont ces protéines pourraient être impliquées dans sa régulation [GRUNWALD *et al.*, 1995, 1999].

Les nombreuses études dont la division cellulaire est l'objet ont permis de démonter en partie les mécanismes de contrôle et de régulation de cette fonction, essentielle pour la cellule aussi bien que pour l'organisme auquel elle appartient. Un grand nombre d'énigmes reste encore à résoudre, aussi bien dans la compréhension générale du cycle, que dans la manière de rétablir un fonctionnement normal lorsque la cellule devient tumorale. Cependant, les facteurs environnementaux, les interactions entre cellules ou avec la matrice extracellulaire (voir chapitre VI) ou divers facteurs solubles (facteurs de croissance, hormones...) sont capables de contrôler certaines étapes de la prolifération cellulaire. Les données récentes sur l'étude des interactions cellule-matrice extracellulaire (voir chapitre V) montrent des voies de signalisation cellulaires impliquées dans le contrôle de la prolifération comme de la mort cellulaire.

RÉFÉRENCES

P. CAHEN, D. GRUNWALD, D. PIGOTT, M.P. BROCARD, S. KHOCHBIN & J.J. LAWRENCE - Characterization of a mutated p53 exhibiting a cell cycle-related nuclear translocation. *Int. J. of Oncology*, **5**, 811-817 (1994).

Z. DARZYNKIEWICZ & J. KAPUSCINSKI - Acridine Orange: a versatile probe of nucleic acids and other cell constituents. In : *Flow cytometry and sorting*. M.R. MELAMED, T. LINDMO & M.L. MENDELSOHN eds, Wiley-Liss, 2nd edition (1990).

J.W. GRAY, F. DOLBEARE & M.G. PAVALLICINI - *Quantitative cell-cycle analysis. In : Flow Cytometry and Sorting*. M.R. MELAMED, T. LINDMO & M.L. MENDELSOHN eds, Wiley-Liss, 2nd edition (1990).

D. GRUNWALD, S. KHOCHBIN & J.J. LAWRENCE - Cell cycle related accumulation of $H1^0$ mRNA: induction in murine erythroleukemia cells. *Exp. Cell Res.*, **194**, 174-179 (1991).

D. GRUNWALD, J.J. LAWRENCE & S. KHOCHBIN - Accumulation of histone $H1^0$ during early Xenopus laevis development. *Exp. Cell Res.*, **218**, 586-595 (1995).

D. GRUNWALD, C. GORKA, S. CURTET & S. KHOCHBIN - In situ analysis of chromatin proteins during development and cell differentiation using flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*, **119**, 443-453 (1999).

D.M. PRESSCOTT - *La cellule*. Medecine-Sciences, Flammarion, Paris (1989).

X. RONOT & D. SCHOËVAËRT eds - *Dynamique de la cellule vivante. Méthodologies*. INSERM, Paris (1999).

E. SÉGAL-BENDIRDJIAN - Mort cellulaire : signalisation et exécution de l'apoptose. *Hématologie* **5**, 376-387 (1999).

H. STELLER - Méchanisms and genes of cellular suicide. *Science* **267**, 1445-1449 (1995).

E. YONISH-ROUACH, D. GRUNWALD, S. WILDER, A. KIMCHI, E. MAY, J.J. LAWRENCE, P. MAY & M. OREN - p53-mediated cell death: relationship to cell cycle control. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 1415-1423 (1993).

POUR EN SAVOIR PLUS

B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS , M. RAFF, K. ROBERTS & J.D. WATSON - *Biologie Moléculaire de la Cellule*, 3e édition. Médecine-Sciences, Flammarion (1997).

A. BOIVIN, R. VENDRELY & C. VENDRELY - L'acide désoxyribonucléique du noyau cellulaire dépositaire des caractères héréditaires : arguments d'ordre analytique. *C.R. Acad. Sci.* **226**, 1061-1063 (1948).

Cell Multiplication and Differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**(6) (2001).

P.J. CROSLAND-TALYLOR - A device for counting small particles suspended in a fluid through a tube. *Nature* **171**, 37-38 (1953).

Z. DARZYNKIEWICZ, J.P. ROBINSON & H.A. CRISSMAN - *Flow cytometry. Methods Cell Biol.* Academic Press Inc., 41 (1994).

W. GOHDE & W. DITTRICH - Simultane impulsfluorimetrie des DANS-und proteingehaltes von tumorzellen. *Z. Anal. Chem.* **252**, 328-330 (1970).

J.W. GRAY & Z. DARZYNKIEWICZ - *Techniques in Cell Cycle Analysis.* Humana Press, Clifton, New Jersey (1987).

A. HOWARD & S.R. PELC - Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity* **6**, 261-273 (1953).

L.A. KAMENTSKY, M.R. MELAMED & H. DERMAN - Spectrophotometer : new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science* **150**, 630-631 (1965).

M.R. MELAMED, T. LINDMO & M.L. MENDELSOHN - *Flow Cytometry and Sorting*, 2nd Edition, Wiley-Liss Publications (1990).

A. MOLDAVAN - Photo-electric technique for the counting of microscopic cells. *Science* **80,** 188-189 (1934).

H. QUASTLER & F.G. SHERMAN - Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell res.* **17**, 420-438 (1959).

M.A. VAN DILLA, T.T. TRUJILLO, P.F. MULLANEY & J.R. COULTER - Cell microfluorometry : a method for rapid fluorescent measurement. *Science* **163**, 1213-1214 (1969).

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

Chapitre IV

MORPHOGÈNES ET CHAMPS MORPHOGÉNÉTIQUES

Pierre-Simon JOUK

1. INTRODUCTION

Le problème de l'information de position est, depuis le début du siècle, très central en biologie du développement. Il a reposé d'abord sur des données d'observation. Par exemple, les morphologistes avaient perçu très tôt que les cellules et les tissus des membres supérieurs et inférieurs étaient les mêmes. Et pourtant leurs formes sont différentes, il devait donc exister, en plus de l'information orientant les cellules dans des voies de différenciation distinctes, une information de position définissant les **patrons** (au sens de patron de couture, ***patterns*** en anglais) délimitant les arrangements des cellules entre elles. Ce sont ces données qui ont conduit à distinguer conceptuellement différenciation cellulaire et morphogenèse, sans exclure la possibilité de relations entre ces deux phénomènes. Par la suite, les nouvelles techniques de marquage cellulaire *in vivo* au cours du développement embryonnaire ont permis l'élaboration de cartes des territoires présomptifs, c'est à dire d'une représentation chez un jeune embryon du devenir à un stade ultérieur des cellules marquées. Le problème posé par ces études était clairement : quels sont les mécanismes qui permettent à chaque cellule d'être informée de sa position au sein de l'embryon pour réaliser son programme spécifique et en particulier quelles sont les molécules **morphogènes** [1] qui délivrent cette information de position ?

D'autres constatations expérimentales ont été apportées par les techniques d'excision-transplantation. HARRISON en 1918 montrait que la transplantation ectopique de bourgeons de membre à un stade précoce permettait l'obtention de membres en position ectopique, que la transplantation d'une moitié de bourgeon aboutissait au même résultat, enfin que des cellules indéterminées injectées au sein du bourgeon de membre se différenciaient selon le programme du tissu hôte. L'ensemble de ces caractéristiques qui présentent des analogies avec le comportement des charges au sein d'un champ électrique, le conduisit à évoquer

1. Ce concept sera progressivement introduit et mis en exemple dans la suite du texte. Il sera également illustré dans les divers modèles théoriques présentés en annexe.

l'existence d'un champ d'organisation ou champ morphogénétique (CM). Par la suite, les définitions des termes ont été étroitement dépendantes des hypothèses physiopathogéniques sous-jacentes. HUXLEY et DE BEER en 1934 insistaient sur l'existence au pourtour des CM d'un gradient de cellules dont les potentialités morphogénétiques s'amenuisaient très progressivement. De gradient de potentialité à gradient de morphogènes il n'y a qu'un pas et ces auteurs furent parmi les premiers à évoquer la possibilité de l'existence d'un gradient de molécules morphogènes rendant compte des propriétés du CM. Pour SPEMANN (1938), le CM n'était ni plus ni moins que le lieu où s'établissait un système d'induction, découverte qui venait de lui valoir le premier prix NOBEL attribué à un embryologiste. Dans cette seconde définition, le concept de morphogène était beaucoup plus vaste puisque se référant à toute molécule capable de provoquer une induction sur un tissu compétent. Par la suite, le terme de morphogène ou de molécule morphogène s'est progressivement limité à son acception première, pour la simple (et pas très bonne) raison que l'utilisation de ce terme dans son sens large amenait à considérer la majeure partie des molécules impliquées dans l'embryogenèse.

Nous utiliserons donc le terme de morphogène, dans son appellation limitée et la plus habituellement admise : il s'agit d'une molécule qui agit localement pour organiser le patron spatial de différenciation cellulaire en fonction des variations de sa concentration. Le champ morphogénétique est le lieu où le morphogène agit pour contribuer à sa subdivision en plusieurs sous-régions. Il n'est pas équivalent au terme de territoire présomptif[2] évoqué précédemment, ce dernier étant souvent plus large.

2. *LA DROSOPHILE, ANIMAL MODÈLE DE LA GÉNÉTIQUE DU DÉVELOPPEMENT*

La mise en évidence des morphogènes s'est faite chez un des animaux modèles de la génétique et de la biologie du développement : la **drosophile** (ou mouche du vinaigre). Dans cette espèce, le cycle de vie est très court (figure 1), 2 à 3 semaines pour chaque génération. L'embryogenèse dure environ 24 heures, elle aboutit à la formation d'une larve qui est un organisme segmenté assurant des fonctions de nutrition et de croissance. Au sein de cette larve, les futures cellules du stade adulte restent à un stade indifférencié, regroupées sous la forme de petits amas de

2. Une métaphore, que j'emprunte à Lewis WOLPERT, aide à ne pas surestimer le déterminisme strict dont a trop souvent été affublée cette notion. Le territoire présomptif n'est qu'un panneau d'affichage de trains au départ : il nous dit simplement que, si tout se passe comme prévu, telle cellule placée ici se retrouvera là bas au niveau de tel organe à l'issu du développement embryonnaire. En effet, en cas de problèmes, il ne faut pas perdre de vue que des compensations sont possibles, avec des limites bien entendu (les utilisateurs des chemins de fer connaissent bien le problème !).

cellules : les **disques imaginaux**[3], répartis dans les différents segments (par exemple le premier segment thoracique contient deux paires de disques imaginaux, une paire pour les ailes antérieures et une paire pour les pattes avant). On observe successivement 3 stades larvaires en 4 jours, séparés par des mues aboutissant à une nymphe dont la métamorphose dure environ 4 jours. Chaque drosophile adulte vit en moyenne 9 jours, elle assure essentiellement les fonctions de reproduction. Cette rapidité du développement va de pair avec la mise en œuvre de moyens maternels particulièrement efficaces pour produire des œufs et des larves.

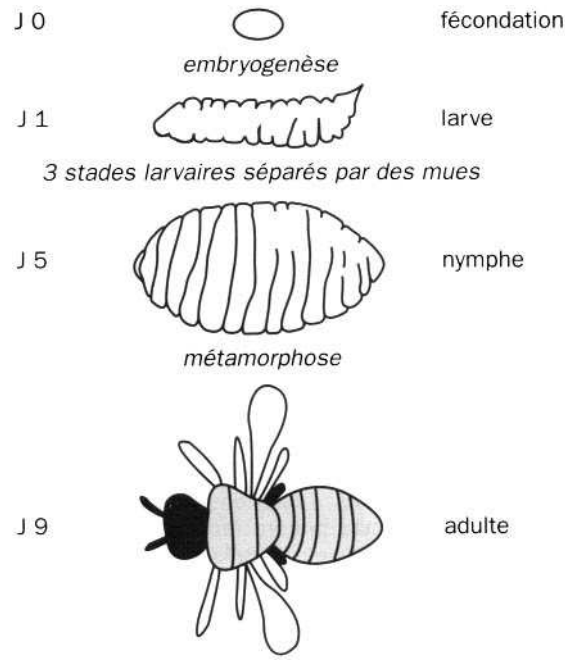


Figure 1 - Cycle de vie de la drosophile

2.1. OVOGENÈSE ET FOLLICULOGENÈSE

Les cellules germinales primordiales sont contenues au sein de tubes appelés ovarioles, dont les parois sont formées par des cellules dites folliculaires. Dans chaque chambre une **cellule germinale** primordiale entreprend une série de 4 divisions mitotiques conduisant à la formation de 16 ovogonies (figure 2), reliées entre elles par des ponts cytoplasmiques, les fusomes.

3. Dès le premier stade larvaire, on peut distinguer les cellules qui mourront avec la larve lors de la métamorphose et les cellules qui se transformeront lors de la métamorphose pour donner naissance aux différents segments et appendices de la drosophile, regroupées à l'intérieur de sacs épithéliaux, les disques imaginaux. Lors de la métamorphose ces disques se déplissent, s'évaginent, se réunissent les uns aux autres pour former la drosophile adulte. Le lecteur intéressé pourra également consulter les modèles théoriques développés par KERNEVEZ dans *Enzyme Mathematics*, chap. 6, North-Holland, 262 p. (1980).

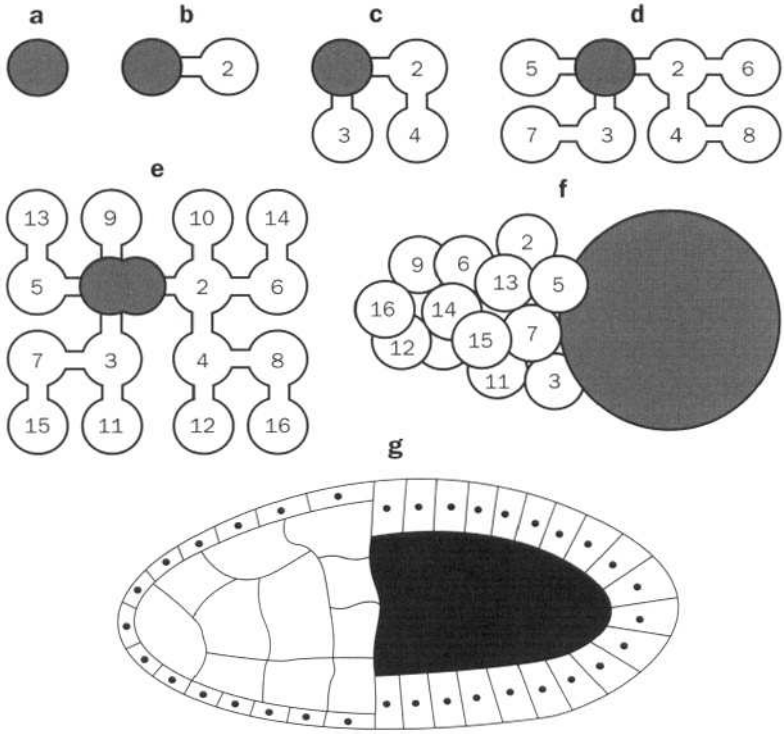


Figure 2 - Ovogenèse et folliculogenèse

a - **e** - représentation diagrammatique des 4 divisions successives d'une cellule germinale aboutissant à la formation d'un ovocyte mature (en noir) et de 15 cellules nourricières. L'ovocyte est constamment une des 2 cellules qui présente 4 fusomes.

f - représentation schématique de la disposition réelle des cellules nourricières et de l'ovocyte.

g - représentation schématique de l'ovocyte et des cellules nourricières au sein de l'ovariole. L'ovocyte est entouré de cellules folliculaires en palissade, les cellules nourricières de cellules folliculaires aplaties.

Parmi les deux seules reliées à quatre voisines, une seule se différenciera en ovocyte, les autres formant les cellules nourricières. Ces cellules nourricières deviennent rapidement polyploïdes[4] et cette amplification génomique va de paire avec une activité transcriptionnelle élevée responsable de la formation d'une quantité considérable d'ARN ribosomal[5] et messager (voir chapitre II) qui sont exportés vers l'ovocyte sous la forme de particules ribonucléoprotéiques. Les cellules folliculaires produisent les réserves nutritives de **vitellus** et synthétisent une enveloppe rigide, le chorion, qui entoure l'œuf. A une de ses extrémités, l'enveloppe est percée par le micropyle qui permet l'entrée du spermatozoïde et la fécondation. Pendant toute cette phase, l'œuf ne fait que consommer ce qui lui est apporté par les cellules folliculaires et nourricières et son noyau est inactif du point

4. Voir chapitre 2, sur la **ploïdie**.
5. Voir chapitre 2, sur les **ribosomes**.

de vue transcriptionnel. Il faut noter que l'ovocyte mature est une structure polarisée dont le noyau est localisé près du futur **pôle rostral** [6] et dorsal du **zygote**.

2.2. EMBRYOGENÈSE [7]

Après la fécondation, la ponte est suivie d'une période de divisions très rapides des noyaux qui sont dupliqués toutes les 9 minutes, sans division cellulaire, aboutissant ainsi à la formation d'un **syncytium** (figure 3). Au stade 256 noyaux, les noyaux se répartissent en périphérie de l'ovocyte. Après 13 cycles environ, 6 000 noyaux sont présents au sein d'un **blastoderme** syncytial.

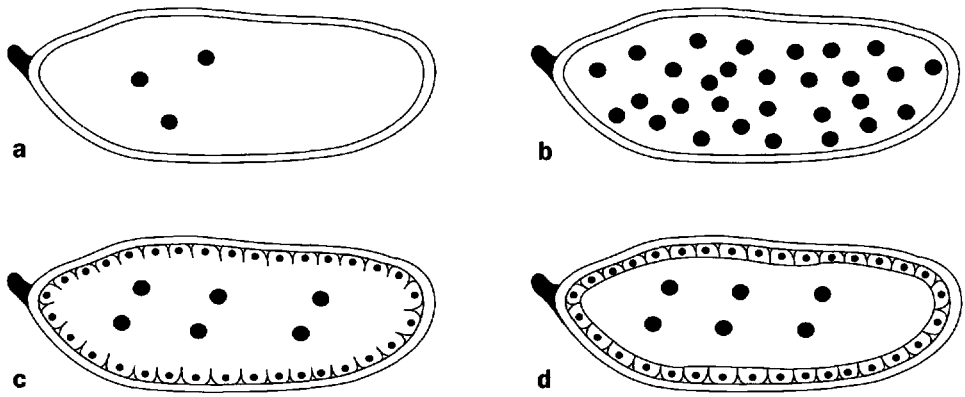


Figure 3 - Embryogenèse - Formation du blastoderme
a - début de réplication des noyaux au sein de l'ovocyte après la fécondation
b - stade syncytial 256 noyaux répartis au sein du cytoplasme de l'ovocyte
c - stade du blastoderme syncytial, la membrane cellulaire commence à s'invaginer entre les noyaux marginalisés
d - Blastoderme cellulaire, les membranes cellulaires sont complètes autour des noyaux

L'invagination de la membrane cellulaire aboutit à l'individualisation des cellules périphériques au stade du blastoderme cellulaire. Seule sa partie ventrale, la

6. La désignation des différents axes de polarité de l'embryon est souvent source de confusion en embryologie. En effet, chez l'adulte, la notion de pole céphalique est claire, elle ne l'est plus chez le très jeune embryon lorsque l'ébauche céphalique n'est pas encore individualisée. Ainsi, on décrit lorsque l'ébauche céphalique est apparue un axe céphalo-caudal, mais on parle d'axe rostro-caudal lorsque l'ébauche céphalique n'est pas encore présente, ou bien encore d'axe antéro-postérieur, le rostre étant la partie la plus antérieure de l'embryon. (Notez bien que cette convention axe rostro-caudal, synonyme d'axe antéro-postérieur et d'axe céphalo-caudal lorsque le pôle céphalique s'est individualisé, que nous utiliserons dorénavant, n'est pas universelle. Pour les anatomistes humains qui représentent leur sujet fièrement campé sur ses membres inférieurs, l'axe antéro-postérieur est synonyme d'axe ventro-dorsal).

7. Pour une introduction en douceur à l'embryologie, citons un excellent livre de bonne vulgarisation de Lewis WOLPERT, *Le Triomphe de l'embryon*, Dunod (1992), ainsi que le chapitre 21 *Mécanismes cellulaires du développement* du livre de Bruce ALBERTS *et al.*, *Biologie moléculaire de la cellule*, Médecine-Sciences, Flammarion, 1037-1138 (1994), qui fournit toutes les bases nécessaires.

bandelette germinative, contribuera à la formation des structures adultes. A ce stade le blastoderme cellulaire a la forme d'un « ballon de rugby ».

La mise en place des feuillets embryonnaires se fait, pour l'endoderme, par invagination des deux extrémités antérieures et postérieures (figure 4).

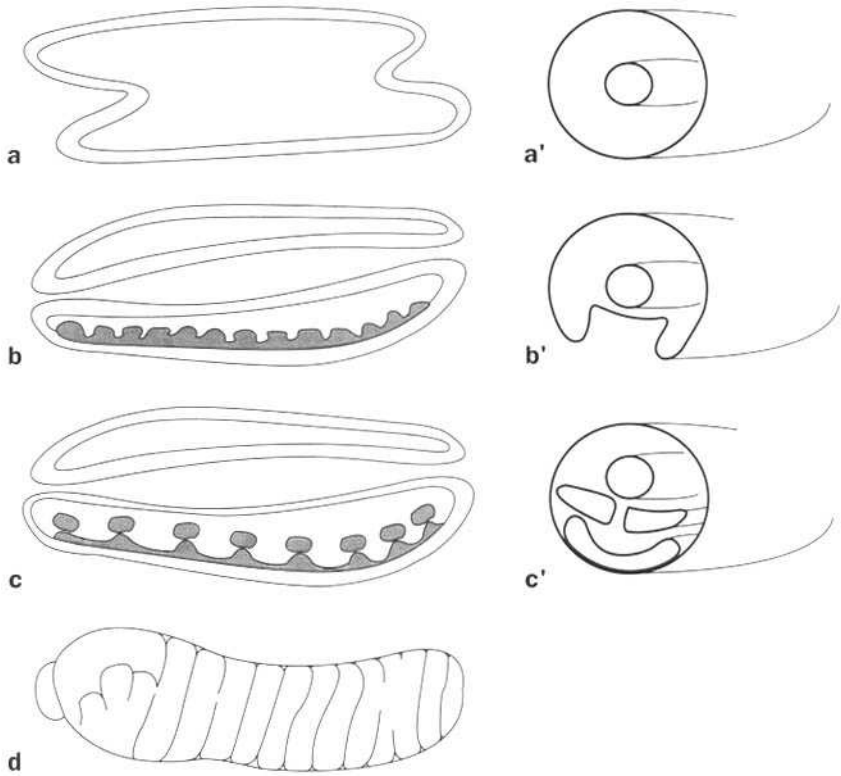


Figure 4 - Embryogenèse - Gastrulation et segmentation
En **a**, **b** et **c** coupe sagittale, en **a'**, **b'** et **c'** coupe transversale de la partie caudale, vue de 3/4. En **d**, vue latérale de la larve. Cette représentation est très schématique : en particulier, la phase d'extension puis de rétraction de la bandelette germinative n'a pas été représentée. **a** et **a'** - mise en place du tube digestif, l'endoderme, par invagination des 2 extrémités antérieure et postérieure du blastoderme. **b** et **b'** - mise en place du mésoderme par invagination de la paroi ventrale du blastoderme. **c** et **c'** - mise en place du tissu neural. **d** - aspect de la larve segmentée.

La mise en place du **mésoderme**[8] et la neurulation[9] requièrent une invagination ventrale. Elle est rapidement suivie par la segmentation et la mise en évidence du patron corporel sous forme de 14 segments successifs chez la larve (3 céphaliques,

8. Il y a 700 millions d'années (les archives fossiles d'Ediacara nous ont apporté de bons éléments de preuve) sont apparus des animaux à symétrie bilatérale à qui on donne le nom générique de bilatériens. Ces bilatériens sont les premiers animaux qui présentent, lors de la période embryonnaire, 3 feuillets distincts : l'ectoderme d'où dérivent les téguments et le système nerveux, le mésoderme d'où dérivent les tissus de soutien, les muscles, et l'endoderme d'où dérive le tube digestif. La drosophile et l'homme sont tous les deux des bilatériens.

3 thoraciques, et 8 segments abdominaux), qui présentent chacun des caractéristiques morphologiques distinctives observables à la loupe binoculaire. A l'issue de l'embryogenèse, la larve de drosophile présente une polarité antéro-postérieure et dorso-ventrale et est segmentée.

3. L'ÉTABLISSEMENT DE L'INFORMATION POSITIONNELLE

C'est l'approche combinée génétique et morphologique qui a permis d'élucider les principaux mécanismes mis en œuvre. La première étape a été l'observation de malformations larvaires. On a ainsi observé des mutations (voir chapitre II, § 8) compromettant la mise en place des axes de polarité embryonnaire, des mutations responsables de la délétion de plusieurs segments, altérant leurs caractéristiques, en particulier leur polarité, et modifiant l'identité de chacun des segments.

3.1. LA MISE EN PLACE DES AXES CORPORELS DU ZYGOTE SOUS LA DÉPENDANCE DE GÈNES MATERNELS

3.1.1. Mise en place de l'axe antéro-postérieur

Les premières mutations qui nous intéresseront sont létales à l'issue du stade larvaire et altèrent la polarité antéro-postérieure. Le mode de transmission génétique de ces malformations est très particulier. En effet, les drosophiles adultes porteuses de ces mutations à l'état **homozygote** n'ont aucune malformation. Par contre, les larves des drosophiles femelles adultes homozygotes pour la mutation causale présentent des malformations de l'axe antéro-postérieur, en l'occurrence l'absence de segments céphaliques ou, à l'inverse, l'absence de segments abdominaux, alors que la descendance des mâles homozygotes est normale. Ceci permet d'évoquer l'existence de gènes maternels intervenant dans la mise en place des axes de polarité embryonnaire.

Les études de **clonage positionnel** ont permis de localiser les gènes maternels en cause, de les identifier et de les caractériser, puis d'étudier leurs mécanismes d'action. Ces gènes maternels sont essentiellement transcrits en ARN au niveau des

9. Initialement, l'ectoderme constitue uniquement l'enveloppe externe du jeune embryon, puis en son sein va se différencier le neuroectoderme qui après invagination va s'individualiser de l'ectoderme pour former le système nerveux. Au cours de la séance de l'Académie des sciences du 15 février 1830, un débat acrimonieux opposa à jamais Georges CUVIER (1769-1832) et Etienne GEOFFROY SAINT-HILAIRE (1772-1844), pourtant amis jusque là. Le premier était fixiste, de ce point de vue les différents plans d'organisation avaient été établis distinctivement lors de la création des espèces, le second soutenait que les mammifères et les insectes dérivaient tous les deux d'un plan d'organisation commun, mais chez les mammifères la neurulation se faisait sur la face dorsale de l'embryon, alors que chez les insectes la neurulation était ventrale. L'académie donna raison alors au premier qui était outre un grand naturaliste, un grand orateur et un grand politique... mais les données scientifiques ont confirmé au XX siècle les vues du second !

cellules nourricières, puis ces **ARNm** sont transférés depuis les cellules nourricières dans le **cytoplasme** de l'ovocyte sous forme d'ARN (voir chapitre I). La traduction des ARNm en **protéines** se fait après la fécondation et la ponte. Les protéines produites forment des gradients de morphogènes (voir annexe IV, § A1) responsables de la segmentation du volume ovulaire. Nous étudierons plus particulièrement deux de ces gènes maternels affectant la polarité antéro-postérieure, les gènes *bicoïd* et *nanos* [10] (figure 5).

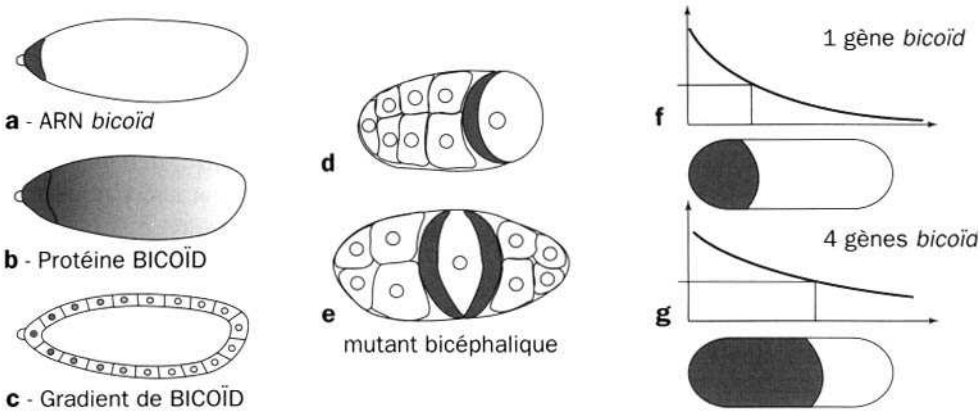


Figure 5 - Mise en place de l'axe antéro-postérieur

a - mise en évidence de la localisation des ARNm *bicoïd* au niveau du pôle antérieur du zygote par **hybridation *in situ***

b - mise en évidence du gradient de BICOÏD au niveau du blastoderme syncytial

c - représentation du gradient de BICOÏD au niveau des noyaux du blastoderme cellulaire

d - représentation en grisé du croissant de *bicoïd* au sein de l'ovocyte, du côté des cellules nourricières

e - construction d'un ovariole au sein duquel l'ovocyte est entouré de part et d'autre par des cellules nourricières et entraînant la formation d'un double croissant de *bicoïd* aux 2 pôles opposés de l'ovocyte, conduisant à une larve bicéphalique

f et **g** - mise en évidence du gradient de BICOÏD et de l'effet de seuil. Les larves avec un gène *bicoïd* fonctionnel (**f**) ont la taille du pôle céphalique inférieure aux larves avec 4 gènes *bicoïd* fonctionnels.

Ainsi, les drosophiles femelles homozygotes pour une mutation du gène *bicoïd* auront des larves sans segments céphaliques identifiables. L'ARN *bicoïd* est déposé à l'extrémité antérieure de l'œuf, du côté des cellules nourricières. Sa **traduction** débute quelques minutes après la ponte et produit une protéine BICOÏD qui diffuse difficilement. Sa concentration est ainsi maximale au pôle antérieur du blastoderme syncytial et diminue progressivement vers l'arrière. Il a été établi que c'était toujours du côté où la concentration de BICOÏD était la plus élevée que la tête se différenciait. Cette démonstration a été apportée par diverses approches expérimentales, microchirurgicales et génétiques, qui ont permis aussi de mettre en évidence le mode d'action de ce gène (figure 5). La protéine BICOÏD est un **facteur**

10. Dans la suite du texte, nous utiliserons une convention habituelle qui est d'écrire les gènes en *italique* et la protéine exprimée en MAJUSCULES.

de transcription du type hélice-tour-hélice (HLH) qui contrôle l'activité des **gènes zygotiques**, le premier à être activé étant *hunchback*.

Les femelles homozygotes pour une mutation de *nanos* ont, elles, des larves sans segments abdominaux identifiables. L'ARN *nanos* s'accumule, lui, au niveau du pôle postérieur de l'ovocyte. Après la fécondation et la ponte, la traduction débute pour produire une protéine NANOS dont la concentration est maximale au pôle postérieur du blastoderme syncytial et qui forme un gradient inverse de celui de BICOÏD. La protéine NANOS n'est pas un **facteur de transcription** mais un inhibiteur de la traduction de *hunchback*. Les mécanismes d'action de BICOÏD et de NANOS, quoique différents, opèrent en synergie (BICOÏD agit au niveau de la **transcription**, NANOS au niveau de la **traduction**). Ils aboutissent tous deux à une accumulation de HUNCHBACK au pôle antérieur du blastoderme syncytial et au contraire à une concentration minimale, voire nulle, de HUNCHBACK au pôle postérieur. HUNCHBACK est lui aussi un facteur de transcription qui contrôle l'activation d'autres gènes zygotiques impliqués dans le déterminisme des segments céphaliques.

A ce stade, deux questions se posent : comment NANOS a-t-il pu s'accumuler au pôle postérieur de l'embryon et pourquoi existe-t-il deux gradients en sens inverse pour moduler la trancription de *hunchback* ?

En effet, l'accumulation de l'ARNm de *bicoid* apparaissait « naturelle », les cellules nourricières déposent leur ARNm dans la région de l'ovocyte qui leur est immédiatement contiguë. Mais, pour les ARNm de *nanos*, ce mécanisme ne peut plus être invoqué : il faut imaginer un mécanisme qui permette le transport des ARNm de *nanos* depuis le versant au contact des cellules nourricières jusqu'au pôle opposé, le futur pôle postérieur. Ces moyens de transport des ARNm *nanos* sont maintenant connus. Pour expliciter ce mécanisme au lecteur qui découvre l'univers de la cellule, nous allons nous permettre une analogie avec le transport ferroviaire, dont nous nous éloignerons progressivement. Le problème est le suivant : comment transporter les « wagons » d'ARNm de *nanos* depuis l'endroit où ils sont déposés par les cellules nourricières, le pôle antérieur de la cellule, vers le pôle postérieur. Il nous faut trouver les rails, la locomotive et le système d'accrochage de la locomotive aux wagons. Les rails existent : ils sont fournis par le **cytosquelette** de la cellule, plus particulièrement par une de ses composantes, les **microtubules** (voir chapitre V). Nous avons vu précédemment que l'ovocyte était d'emblée une cellule polarisée, ce qui signifie que le cytosquelette est polarisé, en l'occurrence les microtubules sont alignés préférentiellement dans le grand axe de la cellule avec une polarité conservée, c'est-à-dire que leur extrémité (–) est située près du noyau, près du pôle antérieur, et leur extrémité (+) à croissance rapide, à l'autre extrémité postérieure. Voilà pour les rails, mais il s'agit de drôles de rails puisque la formation et l'élongation des microtubules est un phénomène actif et permanent (voir annexe V-1). Et, dans la mesure où il existe un complexe protéique qui sert de système d'accrochage liant les extrémités 3' non traduites

(voir chapitre II) des ARNm de *nanos* aux extrémités (+) des microtubules, ceci permet aux microtubules de jouer à la fois le rôle de rail et de locomotive.

Il existe donc deux gradients en sens inverse qui modulent la transcription de *hunchback*. Les hypothèses pour expliquer cette redondance sont nombreuses. Elles ont une valeur heuristique qui justifie qu'elles soient rapportées, mais leurs démonstrations sont difficiles. La première est qu'il s'agit d'un facteur de robustesse dans le codage de l'information positionnelle. En effet, dans l'hypothèse de l'existence d'un seul gradient, on pourrait observer une dépendance marquée vis-à-vis des conditions environnementales, la température en particulier. A température élevée, la diffusion de BICOÏD serait par exemple plus rapide et l'indice de céphalisation (la taille du pôle céphalique par rapport à la taille totale du zygote) plus élevé qu'à basse température. L'introduction de deux gradients tête-bêche a pu alors constituer un avantage sélectif au cours de l'évolution. Dans l'hypothèse d'une information positionnelle qui aurait été codée initialement au cours de l'évolution par un seul gradient, le meilleur candidat paraît être *bicoïd*. En effet, l'accumulation de *bicoïd* du côté des cellules nourricières, qui produisent l'essentiel de cet ARN, apparaît plus simple à mettre en œuvre que l'accumulation de *nanos* du coté opposé.

3.1.2. Mise en place de l'axe dorso-ventral

Le caractère crucial de la détermination de l'axe dorso-ventral tient au fait que c'est selon cet axe que seront spécifiés les trois principaux feuillets cellulaires, ectoderme, mésoderme et endoderme (figure 6). Les principaux gènes maternels affectant la polarité dorso-ventrale sont *dorsal* et *toll*. La spécification ventrale est sous la dépendance d'un gène maternel *toll* dont les ARNm sont uniformément répartis dans le cytoplasme de l'ovocyte et qui codent pour une protéine TOLL qui est un récepteur transmembranaire (voir chapitre V) réparti uniformément sur l'ensemble de la membrane cellulaire de l'ovocyte. L'information de position est assurée ici par les cellules folliculaires situées sur le versant ventral. Ces cellules secrètent SPATZLE, qui est le ligand [11] de TOLL dans l'espace situé entre les cellules folliculaires et l'ovocyte (figure 6). L'activation du récepteur TOLL sur le versant ventral est responsable de l'activation des mécanismes cellulaires qui aboutissent à la coupure du complexe constitué par l'association de la protéine DORSAL (produit du gène maternel *dorsal*) et de la protéine CACTUS. La concentration de la forme libre active de DORSAL est donc maximale au niveau ventral et décroît en direction dorsale. L'activité de DORSAL, qui est un facteur de transcription, sera donc maximale au niveau des noyaux ventraux. Ce premier gradient ventro-dorsal s'étant mis en place, un deuxième gradient va s'installer en sens inverse. Les cellules dorsales du blastoderme cellulaire, avec donc de faibles concentrations nucléaires de DORSAL, sécrètent dans l'**espace périvitellin** le facteur de croissance

11. Les récepteurs sont des protéines présentant des sites de fixation au niveau desquels peuvent se fixer les ligands. La liaison ligand récepteur et la modification conformationnelle qui en découle sont les premières étapes de la transduction des signaux intercellulaires (voir chapitre V).

de la famille des TGF β (*Transforming Growth Factor β*) : DECAPENTAPLEGIC (codé par le gène zygotique *dpp*). Ces gradients, extracellulaire de DDP et intracellulaire de DORSAL, définissent de la région ventrale vers la région dorsale plusieurs **territoires présomptifs** : le mésoderme présomptif, flanqué par l'ectoderme neural puis l'ectoderme.

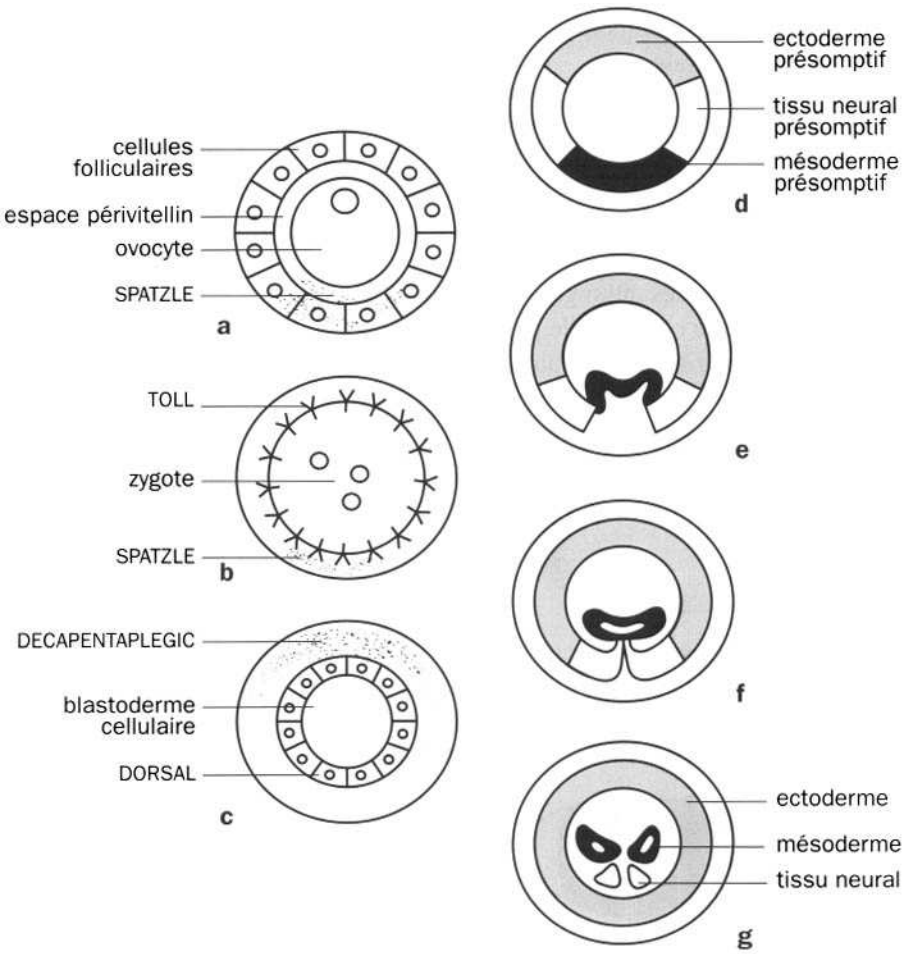


Figure 6 - Mise en place de l'axe dorso-ventral

a - les cellules folliculaires ventrales sécrètent SPATZLE dans l'espace périvitellin.
b - SPATZLE se fixe au niveau des récepteurs TOLL ventraux de la membrane cellulaire du zygote.
c - DORSAL est transloqué dans les noyaux des cellules ventrales du blastoderme cellulaire. Les cellules dorsales pauvres en dorsal sécrètent DECAPENTAPLEGIC dans l'espace périvitellin.
d - sous l'effet de ce double gradient, ventro-dorsal de la concentration intranucléaire de DORSAL et dorso-ventral de la concentration en périphérie du blastoderme de DECAPENTAPLEGIC, 3 territoires présomptifs distincts se mettent en place. L'ectoderme (concentration élevée en DECAPENTAPLEGIC, faible en DORSAL) ; le tissu neural (concentration intermédiaire en DECAPENTAPLEGIC et DORSAL) et le mésoderme (concentration faible en DORSAL, élevée en DECAPENTAPLEGIC).
e - invagination du mésoderme
f - début d'invagination du tissu neural
g - disposition schématique de l'ectoderme, du tissu neural et du mésoderme en place

La mise en place de ces deux axes de polarité embryonnaire est donc, chez la drosophile, sous la dépendance stricte de l'organisme maternel par l'intermédiaire des mécanismes décrits ci-dessus. Dans le cas de la polarité antéro-postérieure, c'est l'ovogenèse qui génère l'asymétrie fondamentale de répartition des cellules nourricières et de l'ovocyte ainsi polarisé. Dans le cas de la polarité dorso-ventrale, c'est l'asymétrie de comportement des cellules folliculaires, en l'occurrence la secrétion de SPATZLE uniquement par les cellules folliculaires ventrales, qui génère la polarité dorso-ventrale.

3.2. LES GÈNES DE SEGMENTATION

Environ 25 gènes, tous zygotiques, ont été impliqués dans ce mécanisme. On les classe en 3 catégories principales :

- ✓ les gènes gap, appelés aussi gènes cardinaux,
- ✓ les gènes pair-rule ou gènes de parité de segment,
- ✓ les gènes de polarité segmentaire. Ces gènes s'expriment dans des zones de plus en plus restreintes. Nous n'en étudierons que quelques uns, en nombre suffisant néanmoins pour bien comprendre leur mode de fonctionnement (figure 7).

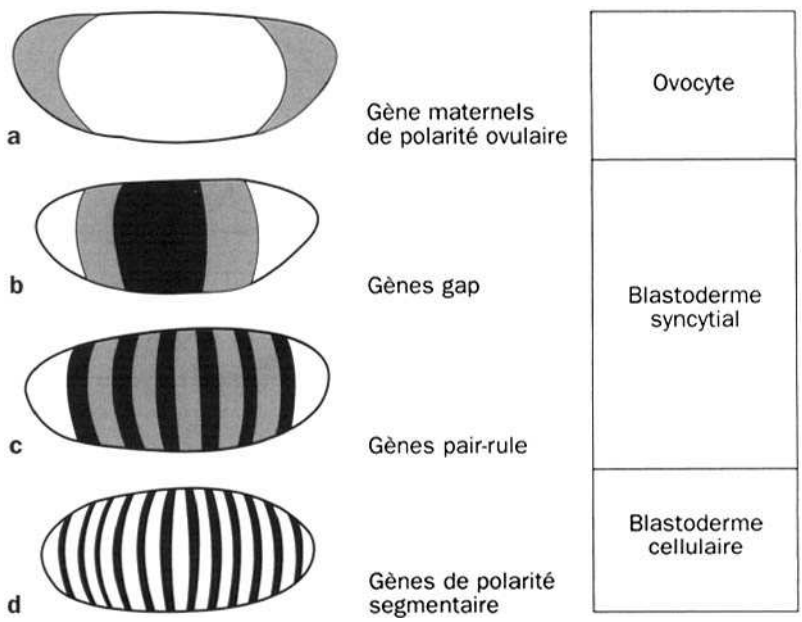


Figure 7 - Succession dans le temps de l'expression des gènes
Les bandes représentent schématiquement la distribution des protéines codées par ces gènes : **a** - gènes maternels qui déterminent les principaux axes de polarité de l'embryon et activent la transcription des gènes zygotiques, **b** - gènes gap qui définissent de larges territoires et activent la transcription des **c** - gènes pair-rule, qui sont exprimés sous la forme de bandes alternées ; **d** - les gènes de polarité segmentaire permettent l'achèvement de la segmentation définitive.

3.2.1. Les gènes gap

L'existence des gènes gap (*hunchback, giant, kruppel, knirps...*) a été initialement inférée à partir de l'étude des malformations engendrées par leur inactivation. Tous sont responsables de la disparition de plusieurs segments consécutifs. Ainsi, les mutations de *hunchback* sont responsables d'une disparition des segments céphaliques. L'inactivation des gènes *giant, kruppel, knirps* entraîne la disparition de segments au niveau des tiers antérieur, moyen et postérieur de la larve. Là encore, les techniques de clonage positionnel ont permis de localiser les gènes en cause, de les identifier et d'étudier leurs mécanismes de régulation. Ces gènes codent pour des **facteurs de transcription.**

L'étude par **hybridation *in situ*** de leur territoire d'expression montre par exemple, pour *giant, kruppel* et *knirps,* des territoires d'expression présents dès le stade du **blastoderme** syncytial, se succédant de l'avant vers l'arrière et se recouvrant partiellement. L'initiation très spécifique de leur transcription, en un lieu et à un moment donné, se fait sous l'action d'une combinaison spécifique d'autres facteurs de transcription, venant se lier au niveau des **séquences** régulatrices (voir chapitre II, § 6) en amont du gène. Par exemple *kruppel* est activé par l'action combinée de BICOÏD et HUNCHBACK à des concentrations moyennes. Toute modification (augmentation ou diminution), conjointe ou dissociée, des concentrations de ces deux protéines par rapport à des valeurs moyennes va se traduire par une diminution de la transcription de *kruppel.*

3.2.2. Les gènes pair-rule

Les malformations dues à l'inactivation de ces gènes sont surprenantes : non seulement elles entraînent une réduction de moitié des quatorze segments normaux, mais de plus cette disparition concerne soit l'ensemble des segments impairs, soit l'ensemble des segments pairs, au lieu d'affecter les sept premiers ou les sept derniers segments de la larve. La disparition des segments pairs est due à l'inactivation du gène *even-skipped*, la disparition des segments impairs est due à l'inactivation du gène *fushi tarazu* [12]. Les territoires d'expression de chaque gène pair-rule sont décelables dès le stade du blastoderme syncytial sous la forme d'une succession de quatorze bandes, les bandes exprimant le gène alternant avec les bandes ne l'exprimant pas (figure 7). Nous sommes habitués maintenant au piège de la nomenclature et nous ne sommes donc plus surpris de constater que les bandes impaires expriment *even-skipped* et les bandes paires *fushi tarazu*. Nous aurons l'occasion de voir cependant que les bandes visualisées par les techniques d'**hybridation *in situ*** ne correspondent pas aux segments larvaires définitifs, mais à une structure transitoire, le parasegment, qui est décalé par rapport au segment correspondant de la largeur d'un demi-segment. La découverte de ces structures alternées faisait évoquer la possibilité d'un mécanisme de réaction-diffusion à

12. On aurait pu s'attendre à ce que ce gène s'appelle *uneven-skipped*, mais c'est une chercheuse japonaise qui a identifié ce gène et *fushi tarazu* signifie « trop peu de segments » en japonais.

l'origine de leur mise en place (voir annexe IV, § A.2). Las ! Les investigations récentes ont montré que l'expression des gènes *even-skipped* et *fushi tarazu* au niveau de chaque bande était sous la dépendance d'une combinatoire précise de facteurs de transcription. Par exemple, au niveau de la bande 3, *even-skipped* s'exprimera en présence d'une concentration adéquate de facteurs de transcription jouant le rôle d'activateur, en l'occurrence HUNCHBACK et BICOÏD. Parallèlement, l'inhibition de son expression sur les bords de cette même bande 3 est sous la dépendance des facteurs de transcription KRUPPEL et GIANT, qui jouent le rôle de répresseurs (figure 8). Toute modification expérimentale du profil de répartition de ces quatre facteurs de transcription est responsable d'une modification de la position et de l'étendue de la bande 3. La **dissection génétique** [13] des régions régulatrices du **promoteur** d'*even-skipped* a par ailleurs montré qu'elles possédaient bien des sites de fixation pour ces quatre facteurs de transcription.

Origines de la dénomination des gènes embryonnaires

Il n'est pas inutile de réfléchir quelques instants sur les bizarreries de la dénomination des gènes. Elle n'est pas uniquement le fait de quelques esprits facétieux, mais plutôt une conséquence historique de la façon dont les connaissances ont été acquises. En effet, dans la première moitié du XXe siècle, l'existence des gènes impliqués dans les processus embryonnaires a le plus souvent été d'abord déduite de l'observation des **phénotypes** anormaux induits par des mutations responsables d'une inactivation du gène en cause. Il était logique, à ce stade, d'appeler par exemple *dorsal* un gène dont les mutations étaient associées à une altération de la polarité dorso-ventrale. Il n'est pas étonnant de constater, dès lors que les techniques de génétique moléculaire ont permis d'étudier l'expression des gènes au cours du développement normal, que l'**allèle** [14] sauvage ou normal s'exprime dans les régions ventrales (son inactivation est bien responsable d'un phénotype « dorsalisé », c'est à dire sans structure ventrale). La dénomination du gène reste relativement explicite dans le cas de *hunchback* (signifiant « bossu » en anglais), dont la mutation est à l'origine d'un phénotype, non seulement altérant la polarité antéro-postérieure, mais aussi responsable d'un aspect bossu de la larve.

Parfois, l'art de la description morphologique étant complexe, la signification peut devenir très cryptée et fonction de la nationalité des chercheurs. Par exemple, *spatzle* a été désigné par une équipe de chercheurs d'Heidelberg en référence à un type de pâtes, très populaires en Allemagne, qui ont un aspect torsadé. Nous aurons l'occasion de rencontrer d'autres exemples aussi pittoresques. Mais au delà du pittoresque, il faut bien retenir que cette remarque sur la nosologie est valable pour toute la génétique, y compris celle des maladies humaines.

13. Ce terme est introduit ici de façon générique pour désigner en fait un ensemble de méthodes génétiques qui vont permettre de localiser et d'ordonner entre elles les différents régions régulatrices situées généralement en amont du promoteur d'un gène. C'est au niveau de ces régions régulatrices que se situent par exemple les sites de liaison des facteurs de transcription.

14. Il est intéressant de revenir sur le terme d'**allèle** pour préciser sa signification par rapport aux autres termes d'usage courant en génétique du développement. Nous avons défini les allèles comme les différentes versions ou copies d'un même gène. La cause de l'existence de ces différents allèles est la survenue de mutations, et parfois certains auteurs confondent le terme de mutation et d'allèle en parlant de transmission d'une mutation sauvage ou pathologique. Cet usage est impropre, car stricto-sensu le terme de mutation devrait être réservé à l'événement qui transforme un allèle en un autre, mais il est tellement fréquent que l'on a circonvenu le problème

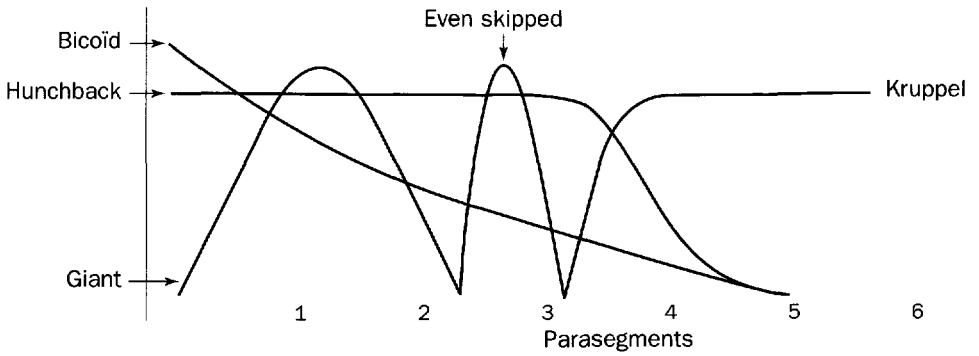


Figure 8 (d'après WOLPERT *et al.*, 1999)
Au stade du blastoderme syncytial, la répartition en bande (les parasegments) de l'expression des gènes *pair rule* est sous la dépendance d'une combinaison précise de facteurs de transcription. Par exemple, l'expression de *even skipped* au niveau du parasegment 3 est sous la dépendance d'une combinaison de facteurs de transcription qui viennent se fixer au niveau des sites activateurs (BICOÏD, HUNCHBACK) et au niveau des sites répresseurs (GIANT, KRUPPEL) des régions régulatrices du promoteur d'*even skipped*. Chaque parasegment répond à une combinatoire spécifique de facteurs de transcription. Par exemple le profil des facteurs de transcription nécessaire pour activer *even skipped* au niveau de la bande 5 est différent.

Ces données récentes démontrent donc bien la précision du codage génétique de l'information positionnelle. Si la description des étapes successives conduisant à l'expression très localisée d'un facteur précis de transcription au cours du développement embryonnaire est finalement relativement simple, la compréhension du scénario qui a permis la mise en place, au cours de l'évolution, de cet ensemble complexe de facteurs de transcriptions et de leurs régions régulatrices nous fait par contre défaut. Là encore, les hypothèses ne manquent pas, toujours heuristiques, toujours difficiles à démontrer. Certains évoquent la possibilité que les mécanismes de réaction-diffusion soient intervenus au stade précoce de la mise en place du plan d'organisation [15], puis qu'ils aient été relayés par la mise en place des mécanismes génétiques. Dans la mesure ou la mise en place du plan d'organisation des arthropodes, phylum auquel appartient la drosophile, remonte au Cambrien, il y a environ 570 millions d'années, la démonstration sera difficile à apporter !

---

en désignant par événement mutationnel l'événement qui transforme un allèle en un autre et en acceptant « du bout des lèvres » le terme de mutation comme un mauvais synonyme d'allèle (voir chapitre II).

15. On distingue conventionnellement et classiquement dans le règne animal 22 phylums ou embranchements différents, chacun étant caractérisé par un plan d'organisation de l'organisme différent, par exemple le phylum des chordés auquel appartient l'être humain est caractérisé par l'existence d'une chorde dorsale au cours du développement embryonnaire. Cette chorde est absente dans le phylum des arthropodes auquel appartiennent les insectes dont la drosophile. Ce phylum est caractérisé par contre par un exosquelette cuticulaire qui va entraîner la nécessité de mues successives pendant la croissance de l'animal (voir chapitre VI, § 3.1 et 4.1), par la présence de pattes articulées...

Enfin, l'expression des gènes pair-rule se fait dès le stade du blastoderme syncytial et elle est très transitoire. Ceci rend nécessaire la mise œuvre de mécanismes de stabilisation des limites des segments qui se mettent en place dès le stade du blastoderme cellulaire.

3.2.3. Les gènes de polarité segmentaire

Une fois atteint le stade blastoderme cellulaire, un remaniement profond des parasegments va s'opérer puisque leurs moitiés antérieures et postérieures vont acquérir des caractéristiques morphologiques propres avant de se scinder en deux. Puis la moitié postérieure de chaque parasegment va s'associer avec la moitié antérieure du parasegment suivant pour former les segments définitifs. Ces remaniements sont sous la dépendance des gènes de polarité segmentaire. Par exemple, les larves porteuses d'une mutation inactivant le gène *engrailed* présentent des segments non polarisés, constitués de la duplication de deux moitiés antérieures. Nous envisagerons plus particulièrement les mécanismes d'action de quatre de ces gènes : *engrailed, wingless, hedgehog, patched.*

Les études d'hybridation *in situ* montrent que le facteur de transcription *engrailed* s'exprime au niveau du bord antérieur de chacun des 14 parasegments, que celui ci ait exprimé *even-skipped* ou *fushi tarazu*. Le territoire d'expression d'*engrailed* est extrêmement étroit puisque son étendue antéro postérieure n'est que de quelques cellules (figure 9). Le gène *hedgehog* [16] est activé dans les cellules qui expriment *engrailed*. Son produit HEDGEHOG est une **protéine** transmembranaire présente au niveau des cellules les plus antérieures des parasegments et qui rentre donc en contact avec les cellules les plus postérieures du parasegment antérieur adjacent. Ce contact intercellulaire active une voie de signalisation qui induit l'expression de *wingless* et l'excrétion de WINGLESS dans l'espace extracellulaire. Les cellules exprimant ENGRAILED ont également des récepteurs membranaires fixant WINGLESS, qui active l'expression de *engrailed*, lui-même activant l'expression de *hedgehog*, qui active... Il s'agit ici d'un exemple typique de rétrocontrôle [17] positif, (voir annexe 2 du chapitre II) fréquemment rencontré au cours de l'**épigenèse** [18]. L'interaction de ces trois gènes produit alors au niveau des interfaces cellulaires un processus stable unissant deux hémi-parasegments pour former un segment définitif. Ces segments constituent des structures stables qui pourront chacune faire l'objet d'un programme spécifique de **différenciation cellulaire** et de morphogenèse.

16. « hérisson » en anglais. L'inactivation de ce gène est responsable entre autre d'un aspect en hérisson de la larve.

17. « *feedback* » en anglais.

18. Les modifications épigénétiques, qui sont les conséquences de l'**épigenèse**, sont celles qui surviennent en dehors de toute modification du génome de l'individu.

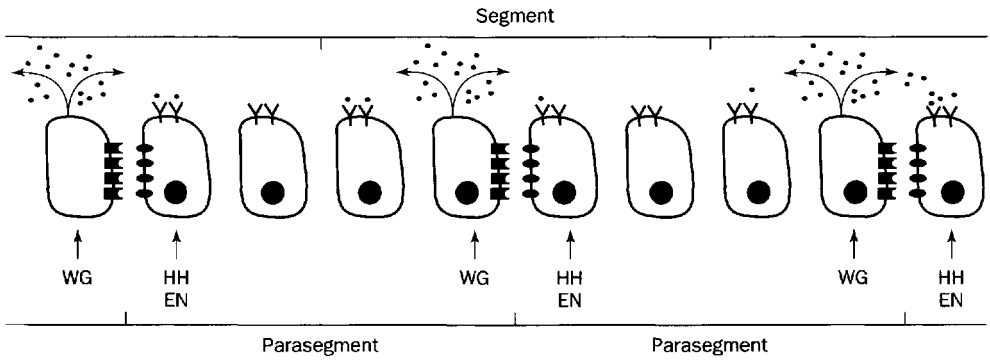


Figure 9 (d'après MÜLLER, 1997)
Délimitation des segments définitifs à partir des parasegments. Le gène de polarité segmentaire *engrailed* (*en*) codant pour un facteur de transcription s'exprime à l'extrémité antérieure de chaque parasegment au stade du blastoderme cellulaire. ENGRAILED (EN) active l'expression de *hedgehog (hh)* codant pour une protéine transmembranaire HEDGEHOG (HH) qui entre en contact avec les cellules postérieures du parasegment situé juste en avant. Ce contact constitue un signal intercellulaire dont la transduction au niveau du noyau entraîne l'expression du gène *wingless (wg)*. WINGLESS (WG) est un peptide secrété dans la **matrice extracellulaire** et dont les concentrations sont décroissantes à partir du site de secrétion. Les cellules qui reçoivent le signal WG activent l'expression de *engrailed*. Il s'agit ici d'un exemple type de rétrocontrôle positif au cours de la morphogenèse aboutissant à la formation d'une structure stable au niveau de l'interface entre chaque parasegment. Les segments définitifs résultent de la scission des parasegments en leur milieu.

3.3. LA SPÉCIFICATION DES SEGMENTS : LES GÈNES HOMÉOTIQUES

Cette spécification des caractéristiques propres à chaque segment est sous la dépendance des **gènes homéotiques**. Nous sortons dès lors du cadre imparti à ce chapitre, centré sur les morphogènes et l'information de position. En effet, nous venons de voir que l'expression des gènes homéotiques spécifiques à chaque segment ne survenait qu'au terme de la mise en place de l'agencement ordonné des segments successifs. Nous ne ferons donc qu'introduire ce pan entier de la biologie du développement en adoptant une approche historique, qui, dans la continuité de la présentation choisie pour ce chapitre, partira de la description des malformations observées dans la nature.

William BATESON décrivait dès 1894 des mutations qui provoquaient le remplacement d'une partie du corps par une structure qui est normalement située ailleurs et appela ces organismes des mutants homéotiques. Les exemples de telles malformations sont nombreux, comme par exemple le remplacement chez la drosophile d'une paire d'**haltères** (normalement spécifique du troisième segment thoracique) par une paire d'ailes (normalement spécifique du deuxième segment thoracique) (figure 10).

On sait maintenant [19] :

- ✓ que ces gènes homéotiques appartiennent tous à une même famille de facteurs de transcription, disposés linéairement sur le chromosome dans l'ordre de leur activation au cours du développement,
- ✓ que chaque segment de la drosophile exprime une combinaison spécifique de gènes homéotiques responsables de l'expression d'un ensemble de gènes spécifique à chaque segment,
- ✓ qu'il existe une colinéarité entre la disposition des gènes homéotiques sur le chromosome et leur expression anatomique au niveau des segments successifs en allant de l'avant vers l'arrière.

Cependant, les mécanismes du couplage entre cet arrangement sur le chromosome, assurant une régulation temporelle séquentielle de l'expression des gènes homéotiques et l'expression sur les segments successifs de la drosophile assurant une régulation spatiale de leur expression sont encore largement inconnus et font l'objet de recherches actives dans lesquelles les approches théoriques pourraient jouer un rôle significatif.

Figure 10 - Mutation homéotique bithorax
Le 3e segment thoracique a acquis les caractéristiques morphologiques du 2e segment thoracique (remplacement des haltères par des ailes) aboutissant à une duplication du 2e segment thoracique et donc à 2 paires d'ailes au lieu d'une seule à l'état sauvage.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le développement précoce de l'embryon de drosophile constitue à ce jour le seul exemple où le fonctionnement du dialogue morphogénétique, tel que nous le conceptualisons actuellement (figure 11), a été observé et analysé, tant au niveau génétique qu'au niveau des interactions cellulaires. Celui-ci part de la morphologie de départ du zygote unicellulaire, qui est déjà le résultat d'une histoire très particulière se déroulant au cours de l'ovogenèse. Nous avons présenté ici les premiers déterminants intracellulaires que sont les morphogènes d'origine maternelle, responsables de l'activation du programme d'expression génique zygotique nécessaire à la mise en place des axes de polarité de l'embryon. Des dialogues morphogénétiques s'établissent dès lors entre les extrémités antérieure et

19. La merveilleuse histoire de la découverte des gènes homéotiques est racontée de façon à la fois vivante et scientifique par un de ses acteurs principaux Walter J. GEHRING dans *La Drosophile aux yeux rouges - Gènes et développement* aux éditions Odile Jacob (1999), un exemple de livre scientifique didactique.

postérieure, ainsi qu'entre les versants ventral et dorsal. Puis, de dialogue en dialogue, l'organisme se complexifie et ces myriades de dialogues morphogénétiques finissent par déboucher sur l'anatomie du stade adulte de la drosophile.

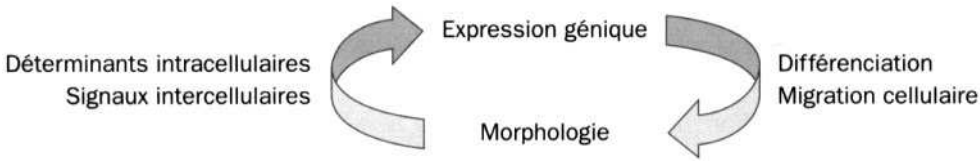


Figure 11 - Le dialogue morphogénétique selon SAGER & KAISER (1995)

En reprenant la définition du morphogène précisée en introduction, les seuls morphogènes *stricto sensu* que nous avons vu opérer sont ceux qui sont exprimés au stade du blastoderme syncytial, à savoir BICOÏD, NANOS, HUNCHBACK... Ensuite, des mécanismes de signalisation intercellulaires ont pris le relais de ce scénario morphologique.

A ce jour, ces exemples de molécules morphogènes restent uniques et il est possible fort possible qu'ils le restent, tout du moins dans le phylum des chordés auquel nous appartenons. En effet, il n'existe pas dans ce phylum de stade syncytial pendant lequel les morphogènes pourraient diffuser facilement à l'intérieur de l'organisme embryonnaire pour spécifier l'information positionnelle. Les informations récentes acquises chez un autre animal modèle de la biologie du développement, *Caenorhabditis elegans*, qui est un petit vers rond appartenant au phylum des némathelmintes [20], commencent à nous montrer comment, au niveau d'un organisme entier, l'information de position se met en place en recourrant exclusivement à une signalisation intercellulaire [21]. Ces processus de signalisation font précisément l'objet du chapitre suivant.

Enfin, quelle que soit la diversité des stratégies de développement mises en œuvre, il est intéressant de constater que les molécules que nous avons décrites lors du développement de la drosophile sont retrouvées au cours du développement dans la plupart des phylums, ce qui témoigne de leur extraordinaire conservation au cours de l'évolution.

20. Le phylum des némathelmintes ou vers ronds est caractérisé par la régression quasi totale du tissu conjonctif de soutien, l'absence totale de cellules ciliées...

21. Vous trouverez une excellente revue générale sur le sujet par Peter A. LAWRENCE, un des acteurs principaux de l'épopée des morphogènes dans *Nature Cell Biology*, vol. 3, E151-E 154 (July 2001) *Morphogens : how big is the big picture*. http://cellbio.nature.com

POUR EN SAVOIR PLUS

B. ALBERTS - *Molecular Biology of the cell*, 3th edition. Garland, New-York (1994).

E.H. DAVIDSON - Later embryogenesis : regulatory circuitry in morphogenetic fields. *Development* **118**, 665-690 (1993).

G. EDELMAN - Morphoregulation. *Developmental Dynamics* **193**, 2-10 (1992).

S.F. GILBERT - *Developmental Biology*, 4th edition. Sinauer associates, Sunderland (1994).

P.A. LAWRENCE - *The making of a fly*. Blackwell Scientific, Oxford (1992).

W.A. MULLER - *Developmental Biology*. Springer Verlag, New-York (1996).

J.J. PANTHIER - Les récepteurs à activité tyrosine kinase et le développement embryonnaire - mutation de torso. *Médecine/Sciences* **8**(10), 1106-1109 (1992).

B. SAGER & D. KAISER - Myxobacterial development : a constructive dialog. *In : Interplay of genetic and physical prosesses in the development of biological form*. D. BEYSENS & G. FORGACS eds, World scientific, 77- 88 (1995).

L. WOLPERT, R. BEDDINGTON, J. BROKES, T. JESSEL, P. LAWRENCE & E. MEYEROWITZ - *Biologie du développement*. Dunod, Paris (1999).

ANNEXE IV

INFORMATION POSITIONNELLE, GRADIENT MORPHOGÉNÉTIQUE ET MODÈLES DE RÉACTION-DIFFUSION

Philippe TRACQUI

Le rôle du concept *d'information positionnelle* [22] en tant que support à l'interprétation des relations entre la position et la destinée des cellules a été présenté en introduction de ce chapitre. Plus récemment, G. EDELMAN (1989) [23] a proposé le terme de « topobiologie » pour spécifier plus directement une modification des interactions cellulaires *via* les molécules d'adhérence (voir chapitre V). Indépendamment de la terminologie utilisée, il est intéressant de préciser comment, dans une démarche de compréhension et d'acquisition de données guidées par le modèle, ce concept biologique d'information de position a été pris en compte et enrichi par des familles successives de modèles théoriques. Ce support théorique est d'autant plus nécessaire que l'émergence d'une morphogenèse observable est précédée par l'établissement d'un **patron** (*pattern*) qui se met en place de façon relativement invisible, même si l'évolution des techniques d'imagerie et de marquage du matériel vivant font reculer cette limite. Les acteurs clés de ce cadre conceptuel sont naturellement les **morphogènes** : c'est en effet le gradient spatial de leur concentration qui détermine le patron initial en définissant un système de coordonnées relatives par rapport auquel une cellule est capable de « reconnaître » sa position et de s'engager dans une voie de **différenciation** spécifique en fonction de son programme génétique.

Nous ne reviendrons pas sur l'identification expérimentale des divers morphogènes potentiels, relativement récente et souvent délicate dans la mesure où le « candidat morphogène » doit satisfaire un « cahier des charges » bien spécifique. L'existence de morphogènes étant admise, le problème de la mise en place d'un gradient spatial des morphogènes reste entier. Celui-ci peut en effet résulter de la combinaison de plusieurs processus biologiques et biophysiques dont l'expression dynamique globale ne peut se comprendre qu'à partir de la formulation de modèles théoriques associés. Les paragraphes suivants illustrent brièvement cette proposition, en partant de modèles théoriques simples, élaborés en liaison étroite avec des modèles expérimentaux pertinents développés dans le corps du chapitre.

---

22. L. WOLPERT - Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. Theor. Biol.* **25**, 1-47 (1969).
L. WOLPERT - Positional information revisited. *Development* Suppl., 3-12 (1989).

23. G. EDELMAN - La Topobiologie. *Pour la science* **141**, 46-55 (1989).

A1. CODAGE PAR SEUILS ET FORMALISATION DU MODÈLE DU DRAPEAU FRANÇAIS

Dans son appréhension la plus simple, l'apparition d'un gradient de concentration est considérée essentiellement comme résultant de l'existence d'une source et d'un puits de morphogène aux bornes du domaine spatial considéré. Ce gradient rend opérationnel un codage par seuil (figure AIV.1) qui fonctionne selon le modèle dit du drapeau français, introduit par L. WOLPERT[24] : les cellules situées au tiers gauche vont « devenir » bleues, celles au centre blanches...

Ce modèle théorique simple rend compte de plusieurs observations expérimentales, liées à une modification de la source de morphogène :

- ✓ son ablation entraîne l'absence de gradient,
- ✓ sa greffe de l'autre côté du tissu inverse la polarité du gradient,
- ✓ la greffe d'une seconde source duplique la structure (symétrie en miroir), avec perte éventuelle de la structure centrale.

Une formulation explicite de ce modèle pictural du drapeau français permet d'obtenir quelques éléments de quantification. Considérons un morphogène de concentration c ($\mathbf{x}$,t) (le vecteur $\mathbf{x}$ désigne la position dans l'espace, t le temps) qui diffuse dans un tissu biologique (ou une **matrice extracellulaire**) entre une première interface où il est produit à une concentration fixe et une seconde interface, qui joue le rôle d'une frontière imperméable à travers laquelle il ne peut pas diffuser. A ce transport par diffusion, idéalement isotrope, peut éventuellement se superposer une dégradation du morphogène par certaines cellules présentes dans le tissu. En supposant que celles-ci sont réparties de façon homogène et que cette dégradation suit une cinétique linéaire de coefficient k, ce scénario morphogénétique est représenté dans un espace mono-dimensionnel par l'équation aux dérivées partielles[25] :

$$\frac{\partial c(\mathbf{x},t)}{\partial t} = D\frac{\partial^2 c(\mathbf{x},t)}{\partial x^2} - k.c(\mathbf{x},t)$$

où la constante D représente le coefficient de diffusion du morphogène. Les conditions aux limites sont celles décrites ci-dessus, la condition initiale étant l'absence de morphogène dans le tissu à l'instant initial.

La solution stationnaire asymptotique de ce système est facilement calculable analytiquement. Elle montre que la valeur du gradient de morphogène, et donc le nombre de seuils critiques « actifs » pour l'interprétation de l'information de position par les cellules, est contrôlée par la racine carrée du rapport k/D.

---

24. On trouvera une présentation de ce modèle classique dans le paragraphe « Outils conceptuels » au chapitre 1 du livre *Biologie du développement* - L. WOLPERT *et al.*, Dunod (1999).

25. Le lecteur imaginera sans peine les extensions possibles de ce modèle de base, en particulier en considérant des cinétiques réactionnelles différentes comme les cinétiques enzymatiques michæliennes présentées au chapitre VII.

L'extension de ce modèle simple à des géométries de dimensions supérieures, plus réalistes, est directe. La figure AIV.1 illustre par exemple dans un milieu bi-dimensionnel la « désactivation » des seuils de codage les plus faibles lorsque le coefficient de diffusion du morphogène est deux fois plus élevé [26].

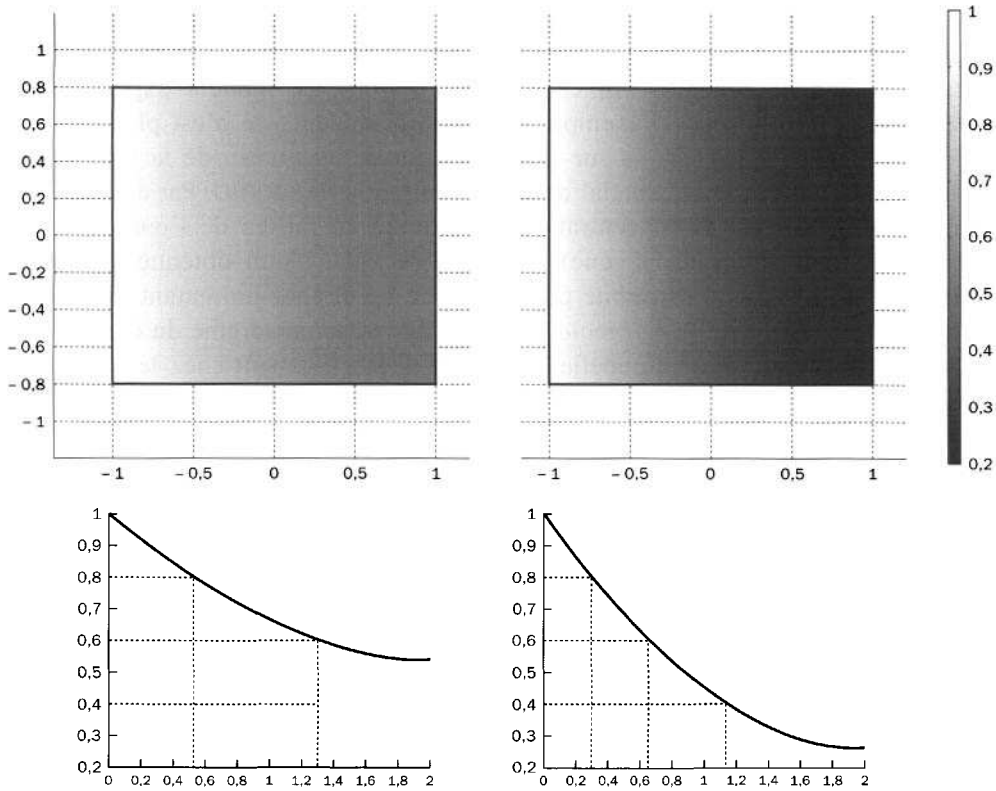


Figure AIV.1

Répartition spatiale dans le plan (x,y) des concentrations stationnaires c(**x**) du morphogène dans le modèle source/frontière imperméable lorsque le coefficient de diffusion du morphogène (de valeur D sur la figure de gauche) devient deux fois plus faible (de valeur D/2 sur la figure de droite), la cinétique de dégradation du morphogène restant elle inchangée. Les densités de gris indiquent la valeur des concentrations locales du morphogène. Sur la figure de gauche, les valeurs de concentrations basses ne sont pas atteintes.

Ces propriétés élémentaires pourraient apparaître comme un simple cas d'école. En fait, elles fournissent un support d'interprétation directe à une série d'expériences maintenant classiques [27] en biologie du développement. Celle qui nous semble la plus illustrative repose sur une sur-expression du gène *bicoïd* dans l'œuf de la drosophile au sein du **syncytium** formé par la série de divisions nucléaires qui a

26. Cette situation peut refléter une modification de la composition ou de la structure du milieu extracellulaire, ou encore un effet de la température (voir chapitre IV, § 3.1.1).

27. Voir chapitre 2.1. de *Biologie moléculaire de la cellule*, 3e édition - B. ALBERTS *et al.* (1995).

lieu sans division cellulaire (voir § 2.2 et la figure 5 de ce chapitre). En effet, la migration des noyaux à la périphérie de l'œuf crée un espace central où des morphogènes peuvent diffuser librement dans le **cytoplasme**. La traduction de l'**ARN messager** du gène *bicoïd*, présent à l'extrémité antérieure de l'œuf, va engendrer un gradient de concentration décroissant de la protéine BICOÏD selon l'axe antéro-postérieur (voir § 3.1.1). Un marquage avec un **anticorps** dirigé contre la **protéine** permet de mettre en évidence ce gradient et son augmentation chez des mutants contenant plusieurs copies du gène *bicoïd*. Ce modèle expérimental matérialise une variante de l'exemple théorique précédent : ce n'est plus l'élimination du morphogène mais sa sur-expression locale au niveau de la source qui contrôle la raideur du profil spatial de la concentration de BICOÏD. Par conséquent, si une valeur seuil c_1 de concentration est atteinte au milieu de l'œuf chez un embryon normal (1 copie du gène), cette même valeur sera obtenue pour une position plus proche de l'extrémité postérieure de l'œuf chez un mutant exprimant par exemple 4 copies du gène *bicoïd*. En accord avec le paradigme du codage par seuils de l'information positionnelle, on observe effectivement chez le mutant la formation, décalée vers l'extrémité postérieure de l'œuf, des segments contrôlés par BICOÏD [28] (voir § 3.1 et figure 5).

La greffe d'une zone d'activité polarisante surnuméraire sur un bourgeon d'aile de poulet définit également un cadre expérimental classique qui conforte le paradigme du codage par seuils associé à un gradient simple de morphogène. Dans ces expériences [29], la zone greffée constitue une seconde source de morphogène qui va induire un second gradient de concentration. La superposition de ce gradient imposé au gradient **endogène** issu de la région polarisante normale induit la formation d'un profil de concentration « en cuvette » qui va provoquer une duplication en miroir des doigts de l'aile. La numérotation des doigts correspond, pour l'embryon normal, à la séquence [2 3 4]. Après la greffe, on observe la séquence miroir [4 3 2 2 3 4]. Intuitivement, on s'attend à ce que la position de la greffe modifie ces séquences en déformant le profil de la « cuvette » de concentration en morphogène. C'est effectivement ce qui se produit expérimentalement, avec un développement des doigts en [4 3 3 4] ou encore en [2 3 4 4 3 3 4] lorsque la greffe sur le bourgeon alaire est réalisée de plus en plus près de la zone d'activité polarisante normale.

---

28. Ce processus ne représente cependant qu'un des éléments de la mise en place plus complexe du plan d'organisation chez la drosophile. Celui-ci s'établit à partir de la formation de gradients multiples selon une hiérarchisation de la signalisation de position : une famille de gènes fournit des signaux de position qui déterminent à leur tour l'expression d'une autre famille de gènes (voir § 3.2). Parallèlement au développement de modèles théoriques plus complets étudiant les effets de ces gradients multiples, soulignons que la précision du codage positionnel résultant a fait l'objet de travaux très récents : B. HOUCHMANDZADEH, E. WIESCHAUS & S. LEIBLER - Establishment of developmental precision and proportions in the early Drosophila embryo. *Nature* **415**, 798-802 (2002).

29. Voir par exemple le chapitre 10 « Organogenèse » du livre *Biologie du développement* - L. WOLPERT *et al.*, Dunod (1999) et la fonction morphogène de la protéine SONIC HEDGEHOG.

A2. DE UN À DEUX MORPHOGÈNES : LE COUPLE ACTIVATEUR-INHIBITEUR DANS LES MODÈLES DE RÉACTION-DIFFUSION

La présentation rapide de ces quelques validations expérimentales ne doit pas cacher les limites du cadre conceptuel initialement développé autour de l'information positionnelle. Dans tous les exemples précédents, l'induction de l'information positionnelle repose sur la mise en place d'une asymétrie essentiellement déterminée par la position d'une ou de plusieurs sources de morphogènes, sans réelle possibilité de régulation du gradient, si ce n'est par le biais du niveau de production du morphogène par la source ou bien par sa dégradation dans l'espace. En particulier, le processus de codage par seuil ne permet pas l'adaptation des proportions à la taille globale du tissu ou de l'organe, sauf si les seuils de concentration sont interprétés avant l'état stationnaire du gradient. De plus, l'amplification de signaux morphogénétiques de faible amplitude, ou encore la régénération spontanée de la source de morphogène, ne sont pas possibles dans ce cadre.

A2.1. Extension du cadre conceptuel proposée par A. TURING

L'article publié par A. TURING en 1952, *The chemical basis for morphogenesis* [30], considéré à juste titre comme un article fondateur pour la biologie théorique, a défini un cadre d'étude beaucoup plus général. Celui-ci ré-évalue le concept d'information positionnelle en considérant que l'apparition d'une hétérogénéité spatiale, voire spatio-temporelle, des concentrations d'un morphogène résulte de la déstabilisation d'un état initial spatialement uniforme sous l'effet de couplages entre des processus de transport par diffusion et de transformation non-linéaires impliquant au moins deux morphogènes. Typiquement, l'un joue le rôle d'activateur en catalysant sa propre formation, tandis que l'autre a un rôle inhibiteur dans le processus réactionnel. Pour certaines valeurs critiques des paramètres caractérisant ces processus, une brisure (bifurcation) de l'état dynamique du système se produit [31] et engendre l'apparition d'une nouvelle distribution spatiale des morphogènes. Cette distribution, moins uniforme et plus structurée, brise en effet la symétrie de l'état uniforme en présentant des profils organisés dans l'espace (figure AIV.3) et éventuellement dans le temps. Elle est obtenue quand l'inhibiteur diffuse plus vite que l'activateur, assurant ainsi un contrôle local de la production de l'activateur dans une zone d'influence qui détermine la longueur d'onde spatiale du patron.

A partir des résultats de TURING, l'étude des modèles de réaction-diffusion en biologie s'est enrichie au cours des vingt dernières années d'un très grand nombre de travaux de recherche. Elle commence également à faire une timide apparition dans les livres d'enseignement de biologie du développement (voir encadré du

30. A.M. TURING - The chemical basis for morphogenesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **B 237**, 37-72 (1952).

31. Cette bifurcation d'état stationnaire dans le domaine réel, élément central dans l'analyse des équations aux dérivées partielles paraboliques associées aux systèmes de réaction-diffusion, est d'ailleurs appelée bifurcation de TURING.

chapitre X de WOLPERT *et al.*, 1999)[29]. Il est vrai qu'une démonstration expérimentale directe en biologie de l'expression de cette instabilité dynamique dans les conditions définies par les travaux de TURING constitue une réelle difficulté (voir § 3.2.2). Il suffit pour s'en convaincre de constater que ces structures de Turing n'ont été mises en évidence que récemment dans des réacteurs à gel[32], systèmes expérimentaux pourtant mieux contrôlables que des modèles biologiques *in vitro*. Nous renvoyons également le lecteur à l'annexe 1 du chapitre V où la formation des **microtubules** à partir de la **tubuline** présente, à la même époque, le premier exemple d'un système biologique *in vitro* qui s'auto-organise par des processus de réaction-diffusion.

Il n'est bien sûr pas possible de présenter ici, ne serait-ce que brièvement, les différents contextes biologiques où la synergie modèles expérimentaux-modèles théoriques de morphogenèse a été mise en œuvre. Le modèle présenté dans le paragraphe suivant a été retenu

- ✓ d'une part pour la diversité de ses comportements dynamiques associée à une simplicité de sa formulation mathématique,
- ✓ d'autre part pour son intérêt biologique, puisqu'il associe un principe majeur de régulation en physiologie, l'homéostasie, à la croissance de structures solides organisées dans l'espace.

A2.2. Un exemple associant régulation temporelle et organisation spatiale

L'os est une forme très dense du **tissu conjonctif** dont la rigidité et la résistance mécanique sont dues à sa structure, faite d'un mélange de particules solides [cristaux de phosphate de calcium (hydroxyapatite)] et de fibres de **collagène** organisées en contre-plaqué (voir chapitre VI) dans l'os adulte. En dépit de sa rigidité apparente, l'os constitue une structure dynamique remarquable à la fois sur le plan temporel (en tant que réservoir de calcium de l'organisme, il joue un rôle majeur dans la régulation des concentrations circulantes de cet ion) et sur le plan spatial. Au cours du développement de l'embryon, les processus d'ossification[33] conduisent à la mise en place d'une architecture élaborée (voir ci-dessous). Dans sa phase mature, l'os est engagé dans un processus continu de remodelage lui permettant en particulier d'adapter sa structure aux contraintes mécaniques qui lui sont imposées.

Sur la base d'un modèle oscillant du métabolisme calcique validé chez le rat[34], J.F. STAUB *et al.* se sont intéressés au développement de l'architecture

---

32. V. CASTETS, E. DULOS, J. BOISSONADE & P. DE KEPPER - Experimental evidence of a sustained standing Turing-type nonequilibrium chemical pattern. *Phys. Rev. Lett.* **64**, 2953-2956 (1990).
P. DE KEPPER & E. DULOS - La Chimie des formes. *Pour la Science* **235**, 34-39 (1997).

33. Les os longs se développent à partir d'une matrice cartilagineuse qui est progressivement remplacée (ossification endochondrale), tandis que d'autres os, comme ceux du crâne, se forment directement sans matrice cartilagineuse pré-existante (ossification membraneuse).

34. A.M. PERAULT-STAUB, J.F. STAUB & G. MILHAUD - Extracellular calcium homeostasis. *In : Bone and Mineral Research*, J.N.M. HEERSCHE & J.A. KANIS eds. Elsevier, 1-102 (1990).

trabéculaire[35] (figure AIV.2) de différents os en développant un modèle de réaction-diffusion. Dans sa version purement temporelle, ce modèle a montré que chez le jeune rat en croissance, l'existence d'un rythme circadien des processus de minéralisation était compatible avec la quasi-constance (homéostasie) des concentrations de calcium plasmatique[36]. Dans la version spatio-temporelle, la diffusion d'agrégats pré-cristallins de calcium-phosphate à l'interface des secteurs calcifiés osseux est couplée aux processus autocatalytiques de minéralisation qui constituent la partie réactionnelle du modèle[37]. Sur le plan formel, ce modèle de réaction-diffusion s'écrit :

$$\begin{cases} \dfrac{\partial X}{\partial t} = D_X \nabla^2 X + F(X,Y) \\ \dfrac{\partial Y}{\partial t} = D_Y \nabla^2 Y + G(X,Y) \end{cases} \qquad (1)$$

la partie réactionnelle traduisant la formation autocatalytique des agrégats représentés par la variable Y, avec :

$$\begin{cases} F(X,Y) = A - (k_1 + k_0 + Y^2)X + k_2 Y \\ G(X,Y) = (k_0 + Y^2)X - (1 + k_2)Y \end{cases}$$

L'interprétation et les propriétés de ce modèle sont présentées dans COURTIN *et al.* (1995, 1997)[37,38] où les auteurs ont simulé le développement de différentes structures spatiales analogues aux structures trabéculaires osseuses (figure AIV.2).

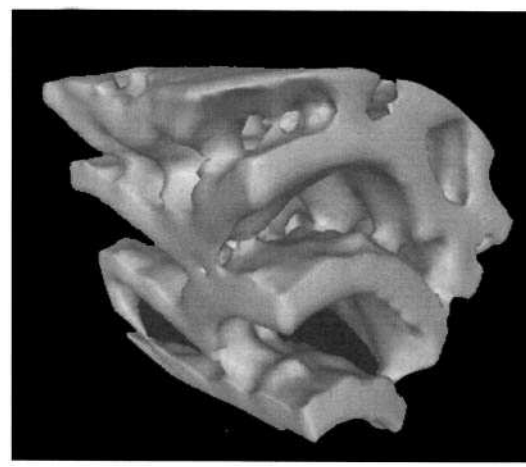


Figure AIV.2
(d'après COURTIN *et al.*, 1997)
Détail de l'architecture trabéculaire osseuse simulée à partir du modèle de réaction-diffusion (1) lorsqu'un bruit aléatoire est appliqué aux paramètres du modèle
Le temps est représenté par la direction verticale. On distingue, au cours de la croissance, une apposition concentrique depuis la surface cylindrique initiale de l'os, avec l'apparition de « pilliers » connectant les couches calcifiées cylindriques sucessives.

35. Cette architecture interne de l'os correspond principalement à des trabécules calcifiées relativement espacées occupées par des tissus conjonctifs et des vaisseaux sanguins (exemple de l'os spongieux). L'autre architecture osseuse correspond à l'os compact, majoritairement formé de tissus calcifiés entourant de petits canaux occupés par des vaisseaux sanguins (voir par exemple la photo introductive du chapitre 22, page 1138) et les paragraphes correspondants (page 1182) dans *Biologie moléculaire de la cellule*, 3e édition - B. ALBERTS *et al.* (1995).

36. J.F. STAUB, P. TRACQUI, P. BREZILLON, G. MILHAUD & A.M. PERAULT-STAUB - Calcium metabolism in the rat: a temporal self-organized model. *Am. J. Physiol.* **254**(1 Pt 2), R134-R149 (1988).

37. B. COURTIN, A.M. PERAULT-STAUB & J.F. STAUB - Spatio-temporal self-organization of bone mineral metabolism and trabecular structure of primary bone. *Acta Biotheor.* **43**, 373-386 (1995).

Ils ont également montré que ce modèle rend compte de manière très satisfaisante de l'auto-organisation de l'architecture osseuse qui se met progressivement en place au cours des premiers jours de développement de l'ossification qui se développe directement (sans cartilage précurseur) sous la membrane (périoste) recouvrant la surface externe du tibia de l'embryon de poulet [38].

Nous présentons sur la figure AIV.3 une rapide illustration de la diversité des formes spatiales qui peuvent apparaître par le biais de ces couplages réaction-diffusion avec ce modèle, sachant par ailleurs que les figures présentées sont naturellement évocatrices des divers motifs de pigmentation observés dans la nature sur le pelage des mammifères, les coquillages, les poissons, les ailes de papillons... Nous renvoyons le lecteur à l'ouvrage *princeps* de J.D. MURRAY (2003) [39] ainsi qu'aux simulations présentées dans les livres de H. MEINHARDT (1982, 1995) [40] pour une présentation détaillée de la morphogenèse de tels motifs.

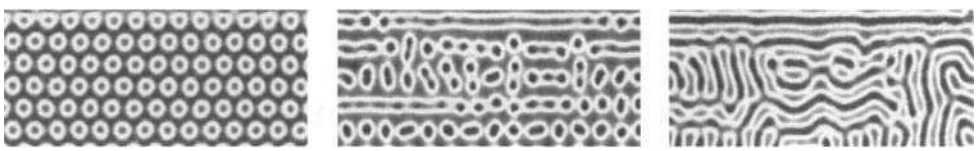


Figure AIV.3 - Exemple de motifs générés par le modèle de réaction-diffusion (1)
On observe la formation de motifs combinant tâches et bandes. Les densités de gris correspondent à la valeur des concentrations locales de la variable X, selon l'échelle de gris indiquée sur la figure AIV.5.

A3. INFORMATION POSITIONNELLE ET FACTEURS MÉCANIQUES

Pour terminer, nous aimerions souligner que les travaux expérimentaux de ces dix dernières années, en mettant clairement en évidence le rôle majeur des interactions mécaniques cellule-matrice extracellulaire dans différents processus morphogénétiques physiologiques et pathologiques, ont renouvelé considérablement la portée du concept d'information positionnelle. En effet, dans le contexte biomécanique qui est celui des tissus vivants, les cellules modifient leur environnement en exerçant sur lui des forces de traction (voir annexe 2 du chapitre V). Elles peuvent ainsi répondre non seulement à des concentrations locales de morphogènes diffusibles, mais également à des modifications locales ou globales des champs de déformations et de contraintes générés au sein de la **matrice extracellulaire**. Cette inhomogénéité de l'espace contrôle la dynamique et le métabolisme cellulaire par

38. B. COURTIN - *Modélisation et simulation numérique de l'architecture interne de l'os embryonnaire*. Thèse de doctorat, Univ. Paris VI (sept. 1997).
B. COURTIN, A.M. PERAULT-STAUB & J.F. STAUB - A reaction-diffusion model for trabecular architecture of embryonic periosteal long bone. *Complexity Int.* **4**, 1-16 (1997).

39. J.D. MURRAY - *Mathematical Biology*, T I et II, 3rd ed. Springer Verlag (2003).

40. H. MEINHARDT - *Models of Biological Pattern Formation*. Academic Press (1982).
H. MEINHARDT - *The algorithmic beauty of seashells*. Springer Verlag (1995).

différentes voies de **mécanotransduction** (voir chapitre V). En particulier, les modifications spatialement contrôlées de la migration cellulaire induisent la formation d'agrégats cellulaires impliqués par exemple dans la morphogenèse des membres ou des phanères[41] (condensation cartilagineuse, formation de placodes[42]...).

Le cadre conceptuel proposé par J.D. MURRAY et G. OSTER dans les années 1980[39] a permis d'étudier théoriquement ces processus. Nous en donnons une illustration ci-dessous avec le modèle mécano-cellulaire proposé par CRUYWAGEN *et al.* (1997)[43] pour décrire la formation de condensations cellulaires au niveau de la peau (figure AIV.4) par le jeu des interactions derme-épiderme[44].

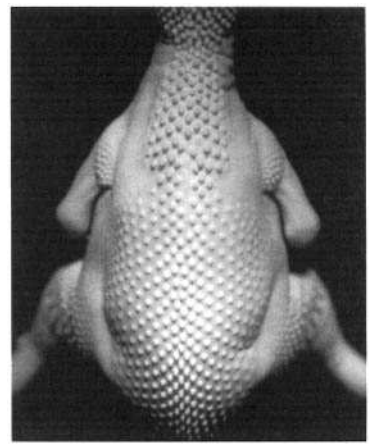


Figure AIV.4
Vue dorsale d'un embryon de poulet de 11 jours montrant la répartition des bourgeons plumaires selon un champ cutané hexagonal extrêmement organisé
Taille réelle : environ 20 × 25 mm
(cliché D. DHOUAILLY, CNRS UMR 5538, Institut Albert Bonniot - La Tronche, reproduit avec son aimable autorisation)

Le modèle proposé par les auteurs s'écrit :

$$\begin{cases} \nabla.(\nabla\theta) = \psi \\ \psi - \nabla.(\beta\nabla\psi) = \rho\theta - \nabla.\left(\nabla\left[\dfrac{\tau.n^2}{1+c.n^2}\right]\right) \\ \dfrac{\partial n}{\partial t} = \nabla.(D\nabla n) + \nabla.(\alpha n\nabla\theta) \end{cases}$$

avec les conditions aux limites de type flux nul :

$$(\eta.\nabla)\psi = 0 \;\; ; \;\; (\eta.\nabla)\theta = 0 \;\; ; \;\; (\eta.\nabla)n = 0$$

41. Ce terme désigne les productions épidermiques à forte teneur en kératine comme les plumes des oiseaux, les écailles des reptiles, les poils des mammifères...

42. Les placodes sont des épaississements délimités de cellules de l'épiderme, associés à la mise en place de condensations régulières de cellules dermiques.

43. G.C. CRUYWAGEN, P. MAINI & J.D. MURRAY - Biological pattern formation on two-dimensional spatial domains : a nonlinear bifurcation analysis. *SIAM J. Appl. Math.* **57**, 1485-1509 (1997).

44. Dans le cas de la genèse d'une plume, le scénario décrit une induction depuis l'épithélium de signaux permettant aux cellules dermiques de migrer et de se condenser. Ces condensations induisent la localisation des placodes de l'épiderme. La placode épidermique induit la prolifération des cellules dermiques de la condensation et le soulèvement du bourgeon plumaire.

Les variables $\theta(\mathbf{x},t)$ et $n(\mathbf{x},t)$ correspondent respectivement à la dilatation volumique de la matrice extracellulaire viscoélastique et à la densité locale des cellules du derme. Les différents termes pris en compte dans les équations de bilan qui constituent ce modèle traduisent :

- ✓ la migration cellulaire par diffusion (paramètre D) et celle induite par un gradient local de déformation (paramètre α),
- ✓ les forces mécaniques exercées par les cellules [amplitude τ et inhibition par la densité cellulaire (paramètre c)],
- ✓ les effets mécaniques à longue distance transmis par le milieu (paramètre β),
- ✓ l'attachement de l'épiderme à la **lame basale** qui le sépare du derme (paramètre ρ) (voir CRUYWAGEN *et al.* (1997)[43] pour une présentation complète du modèle).

La figure AIV.5 montre la répartition inhomogène de la dilation volumique $\theta(\mathbf{x},t)$ apparaissant de façon auto-organisée au sein d'un milieu viscoélastique bi-dimensionnel. Ce profil est également celui de la densité spatiale de cellules $n(\mathbf{x},t)$.

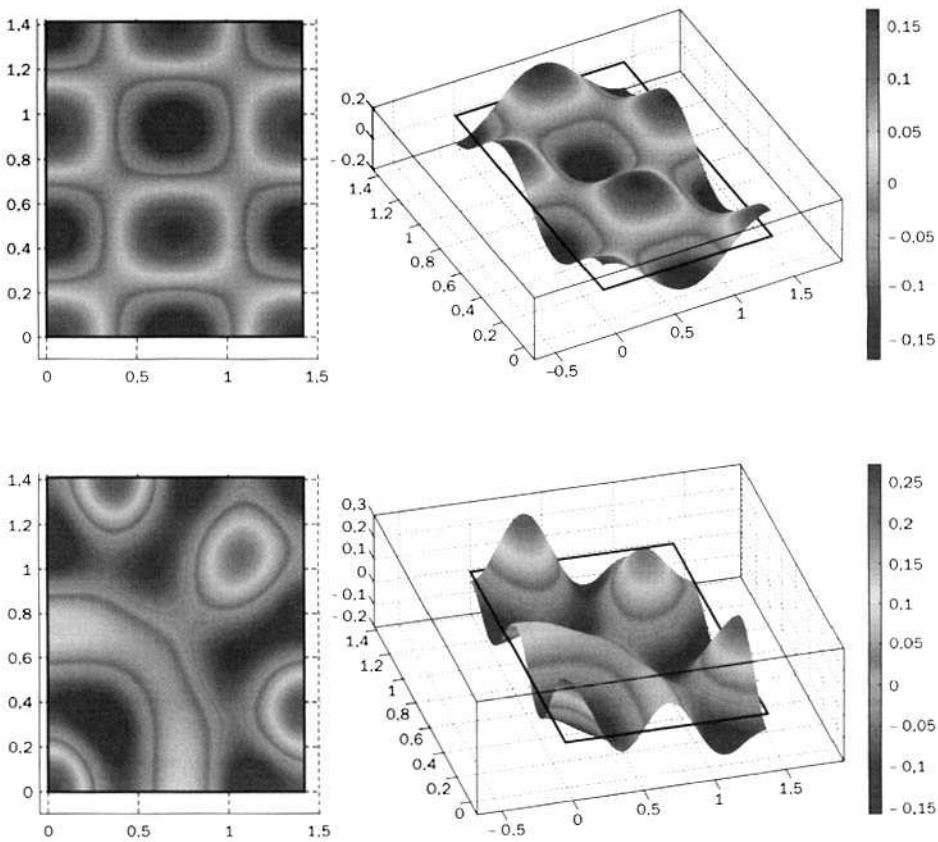


Figure AIV.5 - Simulation par éléments finis du profil spatial stationnaire de la dilatation volumique $\theta_\infty(\mathbf{x})$ d'une matrice extracellulaire visco-élastique déformée par les forces de traction cellulaires La densité spatiale stationnaire des cellules $n_\infty(\mathbf{x})$ suit le même profil.

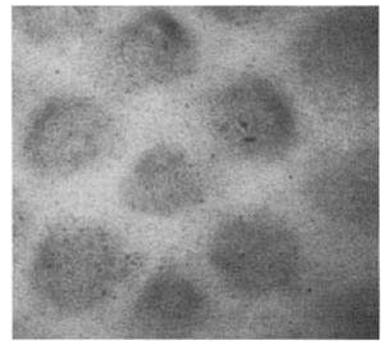


Figure AIV.6
Détail du patron hexagonal formé par la distribution spatiale des ébauches de bourgeons plumaires sur l'épiderme d'un embryon de poulet de 7 jours
Les zones sombres correspondent aux bourgeonnements de l'épiderme, l'ensemble de la figure montrant un motif spatial extrêmement proche de ceux de la figure AIV.5. Taille réelle : environ 0,65 × 0,45 mm. (cliché D. DHOUAILLY, CNRS UMR 5538, Institut Albert Bonniot - La Tronche, reproduit avec son aimable autorisation)

Ces quelques exemples, non exhaustifs [45], montrent que le concept d'information positionnelle se décline avec succès dans différents contextes opérationnels : simple contrôle d'un gradient de concentration, génération d'une brisure de symétrie au delà de valeurs critiques dans des processus non-linéaires de réaction-diffusion, migration cellulaire contrôlée par des déformations mécaniques auto-amplifiées d'une matrice extracellulaire déformable. Cette hiérarchie dans le nombre et les propriétés des acteurs biologiques impliqués traduit la nécessaire spécification des processus biologiques sous-jacents. En effet, dans ces différents exemples, les analogies entre motifs (ou **patrons**), observés et simulés sont étonnantes. La figure AIV.3 montre par exemple la coexistence théorique de taches et de bandes dans un motif spatial, ressemblant tout à fait aux motifs stationnaires observés expérimentalement dans des réacteurs à disque de gel [32]... mais aussi lorsque la formation du réseau de placodes, précédant l'apparition des plumes sur le dos d'un embryon de poulet (figure AIV.4), est perturbée par la présence d'anticorps se fixant aux molécules d'adhérence [23]. Ces ressemblances très fortes révèlent une certaine universalité dans l'émergence de formes spécifiques générées par des systèmes physiques, chimiques et biologiques couplant de façon non-linéaire des processus de transport et de transformation. Sachant que cette universalité dans les observations est à rapprocher de l'universalité des équations mathématiques décrivant ces processus, c'est à l'évidence un large champ interdisciplinaire qui est ainsi défini, les résultats acquis en mathématiques et en physique contribuant à résoudre les questions soulevées en biologie du développement ou dans l'étude de la néo-vascularisation des tissus (angiogenèse).

45. Le lecteur trouvera en particulier dans WOLPERT *et al.* (1999) [24], chapitre 13, une présentation des expériences classiques de régénération de l'hydre d'eau douce basée sur l'existence de deux gradients de morphogènes.

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

Chapitre V

MOLÉCULES D'ADHÉRENCE ET SIGNALISATION CELLULAIRE

Alain DUPERRAY

On connaît depuis longtemps l'importance de l'adhérence cellulaire, car cette adhérence assure l'intégrité des êtres vivants. Dans les organismes multicellulaires, pratiquement toutes les cellules interagissent avec leurs voisines et avec les composants de la **matrice extracellulaire** (voir chapitre VI). De telles interactions ont lieu très tôt après la fertilisation et le processus de l'embryogenèse qui suit fait appel à de multiples interactions entre différentes populations cellulaires (voir chapitre IV). Une fois l'organisme formé, les interactions cellule/cellule et cellule/matrice sont nécessaires pour maintenir les fonctions vitales de l'organisme. C'est par exemple le maintien de l'intégrité de l'**épithélium** [1], ou de la réaction inflammatoire (voir § 6) pour se défendre contre une infection [2]. Des désordres importants dans les contacts cellulaires mettent en péril la survie de l'organisme et il est clair à présent que ce type de perturbation est impliqué dans certaines pathologies, comme la survenue de certains cancers ou des problèmes d'immunodéficience [2].

Les premières études biochimiques sur les **molécules d'adhérence cellulaire** remontent aux années 1970, mais leur connaissance moléculaire précise n'a été possible qu'au début des années 80, grâce notamment aux progrès de la biologie moléculaire. Les techniques de **clonage** ont alors permis de connaître la séquence en **acides aminés** de ces différentes **protéines** (chapitre II) et de les regrouper en grandes familles.

---

1. Un exemple classique est la cicatrisation d'une plaie, qui consiste en la réparation d'une lésion localisée. On assiste alors à une reconstitution du tissu blessé par prolifération et migration des fibroblastes du tissu environnant, suivie par une épithélialisation, avec une néoformation par mitose des cellules épidermiques des bords de la plaie et leur migration à la surface du tissu cicatriciel.

2. Pour une étude détaillée des réactions inflammatoires, voir l'ouvrage *L'Inflammation* de F. RUSSO-MARIE, A. PELTIER, B. POLLA & J. LIBBEY, Eurotext, Paris (1998).

1. LES MOLÉCULES D'ADHÉRENCE CELLULAIRE

Toutes les cellules possèdent à leur surface différents types de protéines leur permettant d'interagir entre elles et avec leur environnement extracellulaire. Ces protéines d'adhérence cellulaire sont des protéines ancrées dans la **membrane cellulaire**, possédant un domaine cytoplasmique, un domaine membranaire et un domaine extracellulaire. Les protéines d'adhérence peuvent établir un lien entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule, car leur domaine cytoplasmique peut se lier aux protéines du **cytosquelette** intracellulaire, tandis que le domaine extracellulaire peut interagir soit avec des protéines de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine ou le **collagène** (voir chapitre VI), soit avec des protéines portées par une autre cellule [GUMBINER, 1996]. Le premier type d'interaction, où une molécule adhésive (le récepteur) lie une molécule de la matrice extracellulaire (le **ligand**), permet aux cellules de se fixer sur un substrat comme la **membrane basale**, sur laquelle reposent les cellules des **épithéliums**. Lors des interactions cellule/cellule, il est difficile de distinguer le ligand du récepteur, et l'on parle plutôt dans ce cas d'une liaison entre un récepteur et un contre-récepteur. Ces interactions cellule/cellule permettent la reconnaissance cellulaire et le maintien de la cohésion des tissus de l'organisme.

Les différents types d'interactions pouvant avoir lieu dans ce dernier cas sont schématisés sur la figure 1. A gauche de la figure, deux protéines d'adhérence identiques, portées par les deux cellules, interagissent ensemble et forment une liaison homophilique . Dans le cas de la liaison hétérophilique (au centre de la figure), les deux protéines qui interagissent sont de type différent. Enfin, deux cellules peuvent entrer en interaction par l'intermédiaire d'un ligand intermédiaire qui établit un pontage en se liant à des molécules adhésives (identiques ou non) exprimées par les deux cellules (figure 1).

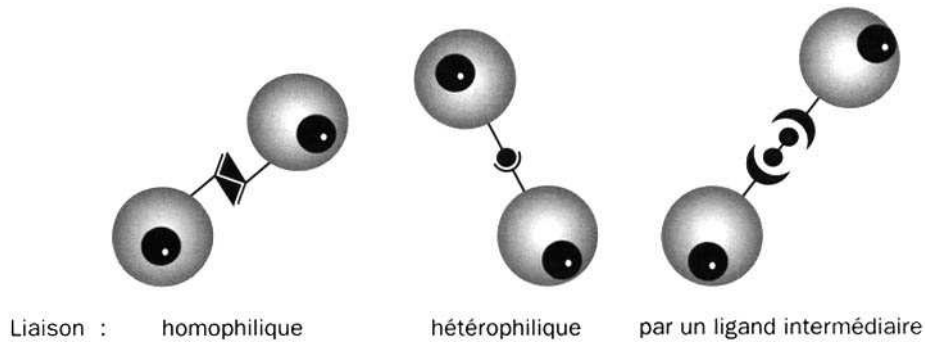


Figure 1 - Les différents types de liaison cellule/cellule

Un grand nombre de molécules d'adhérence cellulaire ont été identifiées. Ces molécules sont réparties en quatre grandes familles de récepteurs adhésifs, en fonction de leurs homologies structurales et fonctionnelles (figure 2) : les **sélectines**, la **superfamille des immunoglobulines**, les **intégrines** et les **cadhérines**.

Les molécules d'adhérence se différencient d'autres récepteurs par leur affinité (voir aussi chapitre VII) relativement basse pour leur **ligand** (de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} $mole^{-1}$) et par une densité habituellement de 10 à 100 fois supérieure à celles des autres récepteurs de surface. Ceci permet aux cellules de se lier simultanément à un grand nombre de molécules de la matrice, mais ceci de façon faible, et les cellules ont donc la possibilité d'explorer leur environnement sans se détacher. Si ces récepteurs se liaient de façon trop forte à leur ligand, les cellules seraient liées à la matrice extracellulaire de façon irréversible et ne pourraient plus se déplacer.

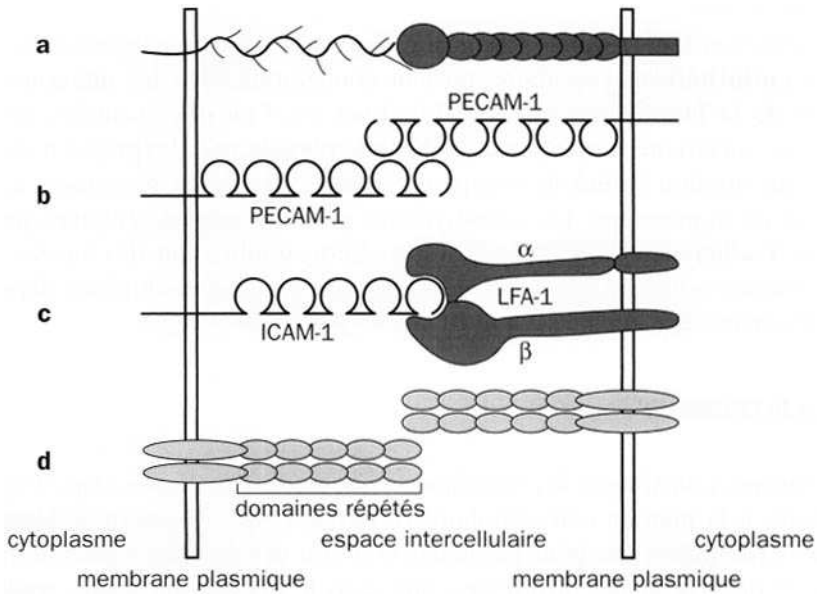


Figure 2 - Les quatre familles de molécules adhésives

a - interaction hétérophilique entre une sélectine (à droite) et une protéine ligand fortement glycosylée (à gauche)

b - deux molécules PECAM-1 de la superfamille des immunoglobulines se lient de façon homophilique

c - une intégrine (LFA-1), composée d'une sous-unité α et d'une sous-unité β liant son contre-récepteur ICAM-1

d - interaction homophilique entre deux cadhérines. Le domaine extracellulaire comprend cinq domaines répétés et l'interaction a lieu par l'intermédiaire du domaine le plus distal.

1.1. LES SÉLECTINES

Ces molécules d'adhérence interagissent avec leur ligand par des liaisons hétérophiliques, et elles ont comme particularité de reconnaître sur leur ligand des carbohydrates[3] [KANSAS, 1996]. Contrairement aux autres familles de récepteurs

3. Composés organiques de formule générale $C_n(H_2O)_p$, plus communément appelés sucres. Ils peuvent former des complexes avec les acides aminés des protéines pour donner des **glycoprotéines**.

adhésifs, qui sont anciennes sur le plan de l'évolution et qui sont exprimées par de nombreuses cellules de l'organisme, les sélectines sont exprimées seulement par les cellules du système vasculaire des vertébrés. Trois sélectines ont été identifiées et leurs noms dérivent du type cellulaire où elles sont exprimées. La L-sélectine est exprimée par les leucocytes, la P-sélectine par les plaquettes mais aussi par les **cellules endothéliales** et la E-sélectine uniquement sur les cellules endothéliales. Ces récepteurs possèdent tous une région extracellulaire caractéristique, composée d'un domaine amino-terminal de type lectine[4], impliqué dans la liaison avec leur ligand (figure 2a).

Les sélectines et leurs ligands jouent un rôle crucial dans l'adhérence des leucocytes à l'**endothélium** vasculaire, où leur coopération avec les intégrines et des membres de la famille des immunoglobulines est l'un des exemples les mieux compris de spécificité d'adhérence cellulaire, régulée par l'expression et l'interaction d'un nombre limité de récepteurs. Cette famille de récepteurs a permis également de montrer que les carbohydrates présents sur les protéines jouent un rôle dans l'adhérence entre deux cellules. Cette implication des sucres dans la reconnaissance cellulaire avait été pressentie par les glycobiologistes depuis bien longtemps, mais cette hypothèse n'avait encore jamais été vérifiée.

1.2. LES INTÉGRINES

Les intégrines constituent les principaux récepteurs impliqués dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire [HYNES, 1999 ; DEDHAR & HANNIGAN, 1996]. Les récepteurs ont pour particularité d'être des protéines hétérodimériques formées de deux protéines différentes, qui, dans le cas des intégrines, résultent de l'association d'une chaîne α et d'une chaîne β liées d'une manière non **covalente** (figure 2). Les deux sous-unités contribuent à la liaison avec le ligand. A ce jour, 18 chaînes α et 8 chaînes β sont connues chez les mammifères, formant en se combinant 24 intégrines différentes... seulement ! En effet, certaines chaînes, comme α_4, ne peuvent s'associer qu'avec une seule forme de chaîne β (β_6), alors que β_1 peut former des hétéro-dimères avec une dizaine de chaînes α, formant des intégrines qui ont chacune des spécificités différentes. Les cations divalents Ca^{2+} ou Mg^{2+} sont essentiels pour la fonctionnalité de l'intégrine et la nature de l'ion peut affecter l'affinité et la spécificité des ligands.

Beaucoup d'intégrines sont des récepteurs pour les protéines de la matrice extracellulaire, comme les fibronectines, les laminines ou les collagènes (chapitre VI). D'autres, comme les intégrines de la famille β_2, sont exprimées seulement par les leucocytes. Elles jouent un rôle important dans l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales en reconnaissant des membres de la famille des immunoglobulines, comme ICAM-1 ou VCAM-1 (figure 2c).

---

4. Les lectines peuvent être définies comme des protéines possédant au moins un domaine non catalytique de liaison réversible à des sucres, et donc aux glycoprotéines.

Ces intégrines sont composées d'un domaine extracellulaire qui se lie au ligand, d'un court domaine trans-membranaire, et d'une partie cytoplasmique courte qui relie ces récepteurs au cytosquelette de la cellule.

La structure des différentes sous unités alpha est très similaire : elles contiennent toutes des domaines répétés homologues de trente à quarante acides aminés dans leur domaine extracellulaire, espacés par des domaines de vingt à trente acides aminés. Les trois ou quatre domaines répétés qui sont le plus extracellulaires contiennent des séquences pouvant lier des cations. Ces séquences sont sans doute impliquées dans la liaison des intégrines à leur ligand car cette interaction est cation-dépendante. Toutes les sous-unités α partagent le même motif d'acides aminés GFFKR [5] dans le domaine cytoplasmique, situé immédiatement après la région transmembranaire. Ce motif peut lier une protéine appelée la cal réticuline, qui joue un rôle dans l'assemblage des dimères d'intégrines.

Les intégrines peuvent, à la suite d'un changement de conformation, passer d'un état de faible affinité pour leur ligand à un état de haute affinité, ce qui permet à la cellule de moduler finement ses interactions adhésives. Les intégrines, après fixation de leur ligand, sont aussi capables de transmettre des signaux vers l'intérieur de la cellule. Ces signaux peuvent initier des réponses cellulaires variées comme la différenciation, la prolifération (voir chapitre III) ou encore la migration cellulaire (voir § 4 ci-après) [DEDHAR & HANNIGAN, 1996]. Les intégrines jouent de fait un rôle fondamental dans l'adhérence des cellules à la membrane basale, la polarisation des cellules et la migration des cellules sur et à travers la matrice extracellulaire.

1.3. LA SUPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES

La superfamille des immunoglobulines (Ig) représente en nombre la plus importante des familles de molécules de surface membranaire. Elle regroupe plus de cent molécules, qui partagent une unité commune d'homologie structurale, le domaine immunoglobuline [6]. Les molécules d'adhésion de la famille des Ig sont impliquées dans les mécanismes de reconnaissance cellule-cellule, et lors du développement embryonnaire. La molécule N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule) est un représentant très étudié de cette famille, exprimée par différents types cellulaires dont la plupart des cellules nerveuses. N-CAM établit des interactions homophiliques entre les cellules (une molécule de N-CAM sur une cellule interagit avec une autre molécule de N-CAM sur une cellule adjacente). D'autres représentants de cette famille établissent des interactions hétérophiliques, en se liant à des intégrines. C'est le cas des ICAMs (Intercellular CAMs), exprimées par les cellules

5. Séquence d'acides aminés : Glycine-Phénylalanine-Phénylalanine-Lysine-Arginine.

6. Boucles d'acides aminés ayant une homologie avec un domaine d'immunoglobuline. Ces boucles sont de composition variable en acides aminés, mais sont caractérisées par l'espacement des résidus cystéines.

endothéliales, qui reconnaissent les intégrines leucocytaires de type β_2 (figure 2). La molécule PECAM-1 (Platelet Endothelial CAM) a, elle, la particularité de pouvoir établir des liaisons homophiliques (figure 2b), mais aussi des interactions hétérophiliques avec des intégrines.

1.4. Les cadhérines

Les cadhérines sont des protéines adhésives calcium-dépendantes qui établissent des interactions cellulaires homophiliques (figure 2d). Les études cristallographiques ont montré que les molécules de cadhérine d'une même cellule s'orientent parallèlement pour constituer des **dimères** qui s'associent à leur tour d'une façon antiparallèle pour assurer le contact entre les cellules voisines. Les cadhérines constituent une famille de récepteurs dont l'étude est en pleine expansion et qui est impliquée dans l'organisation structurale et fonctionnelle de tissus variés.

Les cadhérines sont des protéines transmembranaires, formées d'une seule chaîne polypeptidique (120-140 **kDa** de poids moléculaire) et localisées au niveau de **jonctions** dites **adhérentes**. Les cadhérines classiques sont constituées d'une région cytoplasmique hautement conservée[7] et d'un domaine extracellulaire composé de cinq répétitions structurales.

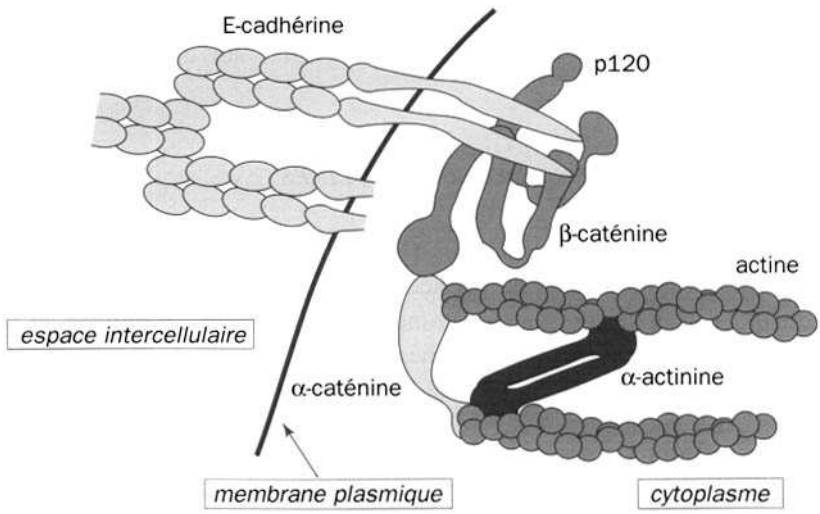


Figure 3
Association d'une cadhérine, la E-cadhérine, avec les caténines et le cytosquelette
Les domaines extracellulaires de deux molécules de cadhérines situées sur deux cellules adjacentes (la cellule de gauche n'est pas représentée, seul un fragment de cadhérine est illustré) s'associent par une liaison de type homophilique. Le domaine cytoplasmique interagit avec la β-caténine et p120. Ces molécules reconnaissent l'α-caténine, qui est reliée au **cytosquelette** d'actine.

7. Cette conservation peut s'expliquer par l'interaction des différentes cadhérines aux mêmes caténines.

L'activité des cadhérines implique une interaction des deux côtés de la membrane cellulaire. Du côté extracellulaire, une interaction homophilique, spécifique de chaque type de cadhérine, fait intervenir des séquences localisées au niveau du premier domaine répété. Du côté intracellulaire, région la plus conservée, l'activité des cadhérines classiques dépend de séquences qui interagissent avec des protéines cytoplasmiques appelées les caténines (figure 3). Ces caténines, au nombre de quatre, l'α-caténine, la β-caténine, la plakoglobine et p120, assurent l'ancrage des cadhérines aux microfilaments d'**actine** du cytosquelette.

2. *LE CYTOSQUELETTE*

Le **cytosquelette** est une structure que l'on trouve dans toutes les cellules eucaryotes (chapitre I). C'est une structure tri-dimensionnelle dynamique qui remplit tout le cytoplasme, et qui forme l'armature fibreuse de la cellule. Il n'est pas visible en microscopie classique et il nécessite donc des colorations spécifiques pour être visualisé (figure 4 et couverture). C'est un composant très important de la cellule, puisqu'il est impliqué dans le maintien de la forme de la cellule, le transport des organelles (chapitre I), la division (chapitre III) et la mobilité cellulaire. Il existe trois types de filaments formant le cytosquelette : les filaments d'actine, les **microtubules**, et les **filaments intermédiaires**.

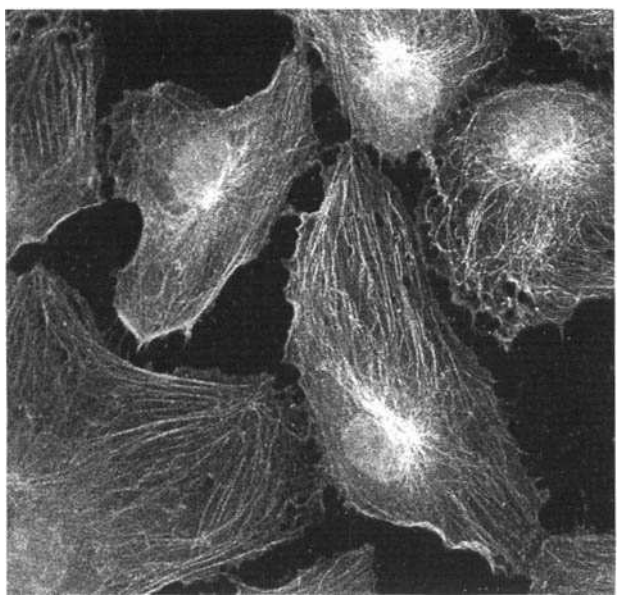


Figure 4 - Cytosquelette d'une cellule endothéliale
Sur cette image prise en microscopie de fluorescence, les noyaux des cellules sont colorés en bleu. Les filaments d'actine, en rouge, sont bien visibles à la périphérie de certaines cellules, et dans tout l'espace intracellulaire dans la cellule en bas à gauche. Les microtubules, en vert, irradient à partir du centre organisateur près du noyau, et sont présents dans tous le cytoplasme (voir illustration de la couverture pour les couleurs).

2.1. *Les microfilaments*

Les **microfilaments** sont des fibres de 3 à 6 nm de diamètre, composées principalement d'actine, qui est une des protéines cellulaires les plus abondantes. L'**actine** est présente dans la cellule sous forme de monomères (actine G ou globulaire) capables de polymériser sous la forme de filaments (actine F ou fibrillaire) après une étape de **nucléation**. Les filaments d'actine ont une polarité structurale qui a pour conséquence l'existence d'une différence dans les cinétiques de polymérisation aux deux extrémités d'un filament. On distingue une extrémité + [extrémité « barbée » (barbed)], où la vitesse d'association des monomères est plus élevée qu'à l'extrémité – (extrémité « pointue ») du filament. La concentration critique d'actine pour laquelle la croissance du filament cesse est donc différente aux extrémités plus et moins du filament. Un équilibre dynamique est obtenu lorsque la concentration d'actine G est constante : dans ce cas, les monomères d'actine s'associent principalement au niveau de l'extrémité plus et se dissocient principalement au niveau de l'extrémité moins, les vitesses d'association et de dissociation étant égales. Cet équilibre dynamique, au cours duquel la longueur nette du filament ne change pas mais où des molécules d'actine sont en permanence transportées d'une extrémité à l'autre du filament, défini un processus connu sous le nom de « tapis roulant » (*treadmilling* en anglais). L'énergie nécessaire à la polymérisation et à ce mécanisme est fournie par l'hydrolyse de l'**ATP** (**A**dénosine **T**ri-**P**hosphate). La longueur des filaments est aussi régulée par des protéines de coiffe, qui viennent se fixer aux extrémités du filament en empêchant la polymérisation ou la dépolymérisation de l'actine.

Les filaments d'actine sont regroupés dans la cellule sous forme de faisceaux compacts, ou sous la forme de réseaux peu denses. Ces structures sont réalisées grâce à des protéines de liaison qui établissent un pontage entre les différents filaments, comme l'ABP (Actin Binding Protein). Par un mécanisme semblable à celui permettant la contraction musculaire, l'interaction de ces microfilaments d'actine avec la **myosine** est responsable de la contraction cellulaire ; phénomène important dans la migration des cellules. Les filaments d'actine sont reliés à la membrane plasmique par des protéines comme la vinculine ou l'alpha-actinine, qui se lient au domaine cytoplasmique des molécules d'adhérence cellulaire (figure 7). Les filaments d'actine sont d'ailleurs concentrés dans les régions où la motilité cellulaire est importante, et au niveau des plaques d'adhésion (voir § 4).

2.2. *Les microtubules*

Les microtubules sont des tubes cylindriques de 24 nm de diamètre dont la longueur peut atteindre des dizaines de micromètres. Ils sont formés par la juxtaposition de protofilaments de **tubuline**. La tubuline est une protéine hétérodimérique formée de deux sous-unités α et β. Comme les filaments d'actine, les microtubules sont des structures polarisées et instables et dont la formation

nécessite de l'énergie (voir annexe V-1). Celle-ci vient de l'hydrolyse du **GTP**[8] (Guanosine Tri-Phosphate). Les microtubules interviennent dans le maintien de la forme cellulaire et servent aussi de chemin pour le transport des organelles et des vésicules. Ce transport nécessite de l'énergie fournie par l'ATP et des moteurs moléculaires qui sont des **protéines** (kinésine, dynéine, voir annexe V-3) à activité ATPasique glissant sur les microtubules. Ils forment également le fuseau mitotique nécessaire à la séparation des chromosomes lors de la **mitose** (voir chapitre III).

2.3. LES FILAMENTS INTERMÉDIAIRES

Les **filaments intermédiaires** ont un diamètre d'environ 10 nm. Contrairement aux deux types de filaments précédents, les filaments intermédiaires sont des structures stables dont la polymérisation ne nécessite pas l'hydrolyse de nucléotides tri-phosphates comme l'ATP ou le GTP. Ils sont formés de plusieurs types de protéines, comme la kératine, la desmine ou la vimentine. Ils participent également au maintien de la forme cellulaire et servent par exemple à connecter les cellules entre elles en se liant au niveau des **desmosomes** (figure 5 et § suivant).

3. LES JONCTIONS INTERCELLULAIRES

Les molécules adhésives sont impliquées dans les interactions cellule/cellule, et dans ce contexte, participent à la formation de structures spécialisées, appelées jonctions intercellulaires, importantes pour le maintien de la cohésion tissulaire, la polarité cellulaire, l'inhibition de croissance provoquée par le contact cellulaire, et la perméabilité vasculaire (voir § 6).

Les jonctions intercellulaires sont classiquement divisées en trois groupes, en fonction de leurs constituants moléculaires, de leur apparence ultrastructurale, et de leur fonctionnalité. Seules les jonctions d'ancrage font intervenir des molécules d'adhérence appartenant aux familles étudiées dans le paragraphe précédent et seront donc plus détaillées ici (figure 5).

3.1. JONCTIONS SERRÉES

Les jonctions serrées ou étanches, (*tight junctions*) servent de barrière bloquant le passage des molécules à travers l'espace intercellulaire. A cet endroit, les membranes plasmiques de deux cellules adjacentes sont étroitement accolées au niveau de leurs feuillets externes.

---

8. Pour une présentation synthétique des principaux types de nucléotides, voir par exemple les planches du chapitre 2 du livre *Biologie moléculaire de la cellule* cité en référence.

3.2. *JONCTIONS D'ANCRAGE*

Les jonctions d'ancrage permettent aux cellules de s'attacher de façon mécanique entre elles et/ou à la matrice extracellulaire (figure 5). On peut distinguer deux principaux types de jonctions d'ancrage : les **jonctions d'adhérence**, qui sont reliées aux filaments d'actine, et les **desmosomes** et les **hémidesmosomes**, qui eux se lient aux filaments intermédiaires.

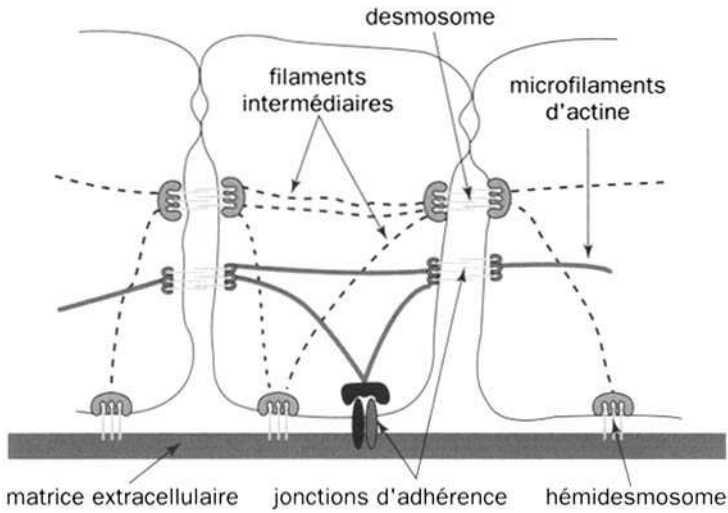


Figure 5 - Jonctions d'ancrage dans un tissu épithélial, et connexion avec le cytosquelette
Les cellules sont reliées entre elles par des desmosomes et des jonctions d'adhérence faisant intervenir des cadhérines. Elles sont ancrées dans la matrice extracellulaire par des hémidesmosomes et des jonctions d'adhérence composées d'intégrines. Les jonctions d'adhérence sont reliées aux fibres d'actine, alors que filaments intermédiaires s'attachent aux desmosomes et les hémidesmosomes.

3.2.1. *Jonctions cellule/cellule*

Les molécules d'adhérence qui interviennent dans les jonctions d'adhérence entre deux cellules sont des cadhérines, reliées au squelette d'actine par l'intermédiaire des caténines comme nous l'avons vu précédemment (§ 1.4). Ces jonctions renforcent l'attachement des cellules entre elles, et, du fait de leur liaison avec le cytosquelette d'actine, permettent aux couches cellulaires ainsi constituées de se déformer et de se contracter.

Les desmosomes font également intervenir des **cadhérines**, mais à l'intérieur de la cellule, ces structures sont rattachées, par l'intermédiaire des caténines, aux filaments intermédiaires.

3.2.2. Jonctions cellule/matrice extracellulaire

Les jonctions d'adhérence entre une cellule et sa matrice extracellulaire permettent à la cellule de s'attacher sur un support, que ce soit de façon transitoire (migration cellulaire) ou persistante. Ces points d'ancrage sur la matrice, reliés à des faisceaux de filaments d'actine, sont appelés les contacts focaux, ou **plaque d'adhérence focale**. Les molécules transmembranaires qui établissent le lien entre le cytosquelette cellulaire et la matrice extracellulaire sont les intégrines (§ 1.2), cette liaison étant réalisée par l'intermédiaire d'un échafaudage de protéines cytoplasmiques comme la taline, l'α-actinine et la vinculine (figure 7). Les hémidesmosomes sont très similaires aux desmosomes, mais connectent la surface basale des cellules à la matrice extracellulaire.

Ces structures desmosomales sont relativement solides et sont importantes dans la formation de tissus soumis à des contraintes mécaniques importantes, comme les **épithéliums**.

3.3. JONCTIONS COMMUNICANTES

Les jonctions communicantes (*gap junctions*), forment des canaux entre deux cellules adjacentes et permettent ainsi le passage de petites molécules (ions, acides aminés...). Ces canaux sont formés de connexines, protéines transmembranaires formées de six sous-unités associées en hexamères ou connexons. Les connexons de deux cellules voisines se joignent pour former un canal d'environ deux nanomètres de diamètre. On retrouve souvent un ensemble de plusieurs canaux dans une même zone de la cellule, formant un complexe de jonction communicante.

4. RÔLES DES MOLÉCULES D'ADHÉRENCE DANS LA MIGRATION CELLULAIRE

En plus de leur rôle dans l'adhérence, les molécules d'adhérence cellulaire ont des effets majeurs dans beaucoup d'aspects du comportement cellulaire. Ces récepteurs peuvent en effet moduler la forme et la polarisation ces cellules, l'organisation du cytosquelette, la motilité, la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire [COX & HUTTENLOCHER, 1998].

La mobilité cellulaire est essentielle dans la plupart des mécanismes physiologiques, comme la cicatrisation des blessures ou la lutte contre les infections par le système immunitaire. Dans certains cas, la migration cellulaire peut également être à l'origine de pathologies observées : inflammations chroniques, développement de l'athérosclérose, cancers...

La plupart des cellules animales sont capables de mouvement, mais certaines cellules, de par leur fonction, sont plus mobiles que d'autres. De plus, on peut

distinguer deux types de migration cellulaire : certaines cellules peuvent se déplacer dans un milieu liquide à l'aide de cils ou de flagelles, comme les spermatozoïdes, alors que d'autres se déplacent sur un support solide en utilisant des molécules d'adhérence. C'est le cas de beaucoup de cellules de l'organisme animal et c'est ce type de migration qui sera étudié dans ce chapitre.

Pour pouvoir se déplacer, une cellule doit pouvoir adhérer à un substrat tout en conservant une certaine mobilité. Il y a là un paradoxe, mais qui n'est bien sûr qu'apparent ! La migration cellulaire résulte d'un équilibre finement régulé entre l'adhérence de la cellule, qui doit prendre appui sur son substrat, et le détachement coordonné de la partie arrière de la cellule afin qu'elle puisse avancer (figure 6).

La migration cellulaire fait intervenir plusieurs acteurs : le **cytosquelette**, qui joue le rôle de moteur contractile, le substrat (déformable) sur lequel la cellule se déplace et prend appui, et les molécules d'adhérence cellulaire qui font le lien entre ces deux domaines intra- et extracellulaire. Ce phénomène a été subdivisé en plusieurs étapes concomitantes [SHEETZ *et al.*, 1998] qui sont détaillées dans les paragraphes suivants.

4.1. EXTENSION DU CORPS CELLULAIRE

Les cellules en migration possèdent une certaine asymétrie, ce qui permet de distinguer l'arrière de la cellule, assez effilé, de l'avant, en général beaucoup plus élargi. Cette polarisation est nécessaire pour que la cellule puisse se déplacer.

Une cellule en migration émet vers l'avant des prolongements cytoplasmiques, soit sous la forme de prolongements fins et aplatis, les lamellipodes, soit sous la forme de fins filaments cylindriques, les filopodes. Ces extensions cytoplasmiques sont très riches en faisceaux de filaments d'actine, qui sont impliqués dans la formation et le maintien de ces structures. L'extrémité « plus » de ces filaments est orientée vers l'extérieur de la cellule, et l'extension du lamellipode est assurée par l'équilibre dynamique entre la polymérisation au niveau de l'extrémité plus en croissance et la dépolymérisation à l'autre extrémité. Cette extension des filaments d'actine fournit sans doute l'énergie nécessaire à la déformation de la membrane (peut-être en interagissant avec la myosine).

4.2. FORMATION DES POINTS D'ANCRAGE

La stabilisation de ces prolongements cytoplasmiques nécessite la formation de sites d'adhérence, qui permettent à la cellule de prendre appui sur son substrat et ainsi de développer les forces de traction (voir annexe V-2) nécessaires au mouvement. Ces structures d'adhérence, qui assurent la liaison physique entre le substrat et le cytosquelette, sont appelées complexes focaux. Ces formations sont de taille plus petite que les plaques d'adhérence focales décrites précédemment, qui peuvent se former dans un second temps. Néanmoins, les complexes focaux sont également

formés grâce aux molécules d'adhérence cellulaire, qui relient le substrat sur lequel repose la cellule (fibronectine, collagène...) au cytosquelette cellulaire par leur domaine cytoplasmique. La formation des complexes focaux entraîne une diminution du nombre de molécules d'adhérence à l'avant de la cellule et donc la nécessité d'un renouvellement de ces molécules. Des expériences ont montré que plusieurs mécanismes étaient impliqués pour maintenir en permanence une quantité suffisante de molécules d'adhérence à l'avant de la cellule. Il y a d'une part un transport de molécules d'adhérence vers l'avant de la cellule, qui a lieu *via* la surface de la cellule, mais aussi à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire d'un transport de vésicules. Le renouvellement des molécules d'adhérence provient aussi d'une synthèse *de novo* à l'avant de la cellule.

4.3. FORCES DE TRACTION

Les forces de traction (voir annexe V-2) nécessaires au mouvement de la cellule sont générées par l'interaction des filaments d'actine avec la myosine. La progression du corps cellulaire est assurée par des forces de contraction qui ont lieu à l'avant de la cellule, alors que la contraction des filaments d'actine à l'arrière de la cellule est impliquée dans la rupture des liaisons cellule/matrice extracellulaire.

4.4. RÉTRACTION ET DÉTACHEMENT DE L'ARRIÈRE DE LA CELLULE

Le détachement des points d'ancrage à l'arrière de la cellule est aussi important que la formation des zones d'adhérence à l'avant de la cellule. Des expériences ont montré qu'au moins pour certaines cellules, ce détachement s'accompagne d'une perte des molécules d'adhérence qui restent fixées sur le substrat. Ce mécanisme fait intervenir la calpaïne, une enzyme qui clive certaines protéines des complexes focaux, rompant ainsi la liaison entre les molécules d'adhérence et le cytosquelette. Les forces de traction générées par la cellule sont alors suffisantes pour que, privées du lien avec le cytosquelette, les molécules d'intégrines soient arrachées de la membrane cellulaire. Le détachement des points d'ancrage fait aussi intervenir des changements d'affinité des intégrines pour leur substrat : l'affinité devenant plus faible à l'arrière de la cellule, les forces de traction cellulaire ont alors une amplitude suffisante (voir annexe V-2) pour détacher les intégrines de la matrice extracellulaire.

4.5. RÉGULATION DE LA MIGRATION

Des mécanismes contraires doivent coexister dans une cellule en migration. Alors qu'à l'avant de la cellule se forment des points d'ancrage qui vont permettre à la cellule d'exercer des forces de tractions, ces zones d'adhérences doivent être rompues à l'arrière (figure 6). De même, les filaments d'actine s'assemblent très

rapidement dans la zone de progression à l'avant de la cellule, alors qu'ils sont dissociés à l'arrière. La coordination spatiale et temporelle des processus mis en jeu lors de la migration cellulaire est encore mal comprise. Des variations locales de la concentration d'effecteurs intracellulaires, comme le calcium, ont été mises en cause : en plus forte concentration à l'arrière de la cellule, il provoquerait la dissociation des filaments d'actine.

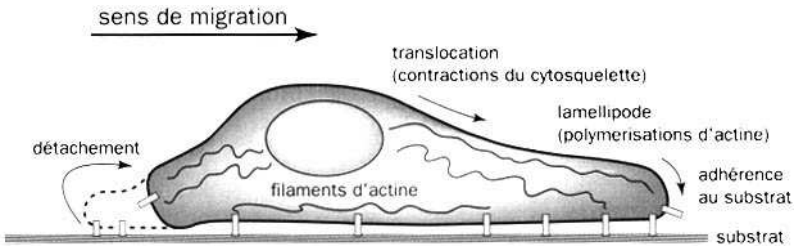


Figure 6 - Représentation schématique des différents processus mis en jeu dans le déplacement d'une cellule

A l'avant du corps cellulaire, l'extension de la membrane plasmique (lamellipode) est suivie par une adhésion de celle-ci au substrat (contacts focaux ou plaque focale d'adhésion). La continuité mécanique du cytosquelette et sa contraction génèrent une force de traction sur ses zones d'adhérence. Le corps cellulaire se déplace vers l'avant d'autant plus facilement que cette traction cellulaire est synchronisée avec le détachement de la partie arrière de la cellule.

La concentration en protéines matricielles de la matrice extracellulaire ainsi que le niveau d'expression des molécules adhésives influent sur la vitesse de migration des cellules. Des auteurs ont ainsi montré que pour des fibroblastes, la vitesse de migration optimale est obtenue pour des concentrations intermédiaires en protéines matricielles [PALECEK *et al.*, 1997] : lorsque ces concentrations sont faibles, la cellule n'adhère pas suffisamment pour développer les forces de traction nécessaires à sa migration, tandis que pour de fortes concentrations, la cellule adhère si fortement qu'elle ne peut plus se déplacer.

Les protéines RhoA, Rac-1 et Cdc42 sont impliquées dans les processus de migration cellulaire. Ce sont des protéines à activité GTPasique, qui sont activées lorsqu'elles sont liées au GTP. Rho régule l'assemblage des adhérences focales et des fibres de stress, qui sont des assemblages de filaments d'actine reliés aux points d'ancrage de la cellule sur son substrat. L'activation de Cdc42 et de Rac-1 induit respectivement la formation des filopodes et des lamellipodes, structures dont la formation est corrélée à la migration.

5. *MOLÉCULES D'ADHÉRENCE ET SIGNALISATION*

Toutes les cellules vivantes reçoivent et répondent à des signaux provenant de leur entourage. Même les plus simples des bactéries perçoivent et migrent en direction d'un gradient de nutriments, comme des acides aminés ou du glucose. Toutefois, c'est chez les eucaryotes multicellulaires que les formes de communication entre cellules atteignent le plus haut niveau de sophistication. En effet, le comportement de chaque cellule dans un organisme pluricellulaire doit être précisément contrôlé, afin de répondre aux besoins de l'organisme. Cette fonction est accomplie par toute une panoplie de molécules de signalisation, sécrétées ou exprimées à la surface des cellules. La plupart des récepteurs déclenchent une cascade de réactions cellulaires, aboutissant à des changements d'expression de certains gènes. Les molécules d'adhérence sont tout naturellement impliquées dans ces phénomènes de signalisation, car de par leur interaction avec d'autres cellules ou avec la matrice extracellulaire, elles renseignent la cellule sur son environnement extérieur. Beaucoup de fonctions cellulaires sont influencées par l'adhérence cellulaire et l'organisation du cytosquelette. Les récepteurs impliqués dans l'adhérence cellulaire sont capables de produire des signaux intracellulaires qui vont réguler divers aspects du comportement cellulaire, y compris l'expression génique [9].

Intégrines et transduction du signal

Les intégrines, après interaction avec leur ligand, activent des voies de signalisation intracellulaire et jouent donc un rôle dans le contrôle de l'expression génique ou dans d'autres aspects du comportement cellulaire. Les plaques d'adhérence focale, qui se forment lorsque la cellule adhère sur la matrice extracellulaire, correspondent à des regroupement de molécules d'intégrines vers lesquels convergent des faisceaux de filaments d'actine (figure 7). Ces plaques contiennent aussi beaucoup de molécules de signalisation. Bien que le domaine cytoplasmique des intégrines ne possède aucune activité enzymatique intrinsèque, on assiste à des **phosphorylations** sur des résidus tyrosines après interaction des intégrines avec des composants de la matrice extracellulaire. La FAK (Focal Adhesion Kinase) joue un rôle très important dans les phénomènes de signalisation impliquant les intégrines [CARY & GUAN, 1999]. Cette enzyme est localisée dans les plaques d'adhérence focale et elle est phosphorylée très rapidement après liaison des intégrines aux composants de la matrice extracellulaire. Des **kinases** sont associées à la FAK et une cascade de signaux intracellulaires se charge ensuite de transmettre l'information jusqu'au noyau.

9. Un exemple classique est donné par les cellules mammaires, qui lorsqu'elles sont cultivées en l'absence de matrice extracellulaire restent peu différenciées, alors que leur culture sur un gel de collagène conduit à des cellules différenciées et inductibles par la prolactine.

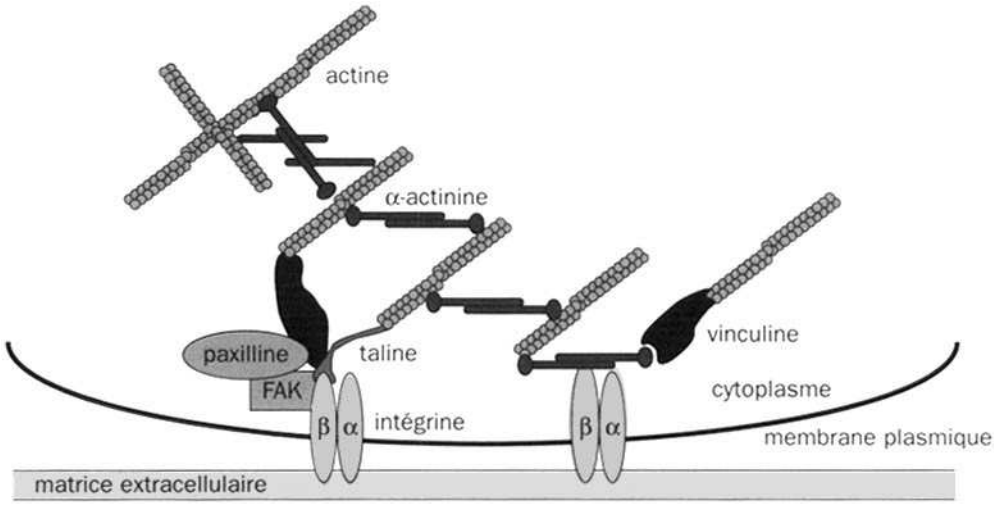


Figure 7 - Schéma très simplifié de la composition d'une plaque d'adhérence focale
Les intégrines à sous-unités β_1 et β_3 peuvent se regrouper et s'organiser dans des structures appelées adhérences focales. Les intégrines se fixent d'abord sur la matrice extracellulaire, provoquant un recrutement de protéines cytoplasmiques reliées au cytosquelette (taline, vinculine), ce qui entraîne un regroupement physique des intégrines. Ceci conduit à un recrutement de protéines mises en jeu dans la transduction de signaux (FAK).

6. *LA RÉACTION INFLAMMATOIRE : UN EXEMPLE FAISANT INTERVENIR LES DIFFÉRENTS MÉCANISMES D'ADHÉRENCE*

Lorsque des bactéries ont réussi à envahir un tissu d'un organisme, on assiste à un phénomène de défense de la part de l'organisme attaqué. Les globules blancs (ou leucocytes) circulant dans le sang sont capables de localiser le site d'infection, de sortir du torrent circulatoire et de migrer en direction des bactéries pour les détruire. Au cours de cette réponse inflammatoire, les leucocytes doivent identifier le site d'inflammation, adhérer à la paroi vasculaire, s'y fixer avec une force suffisante pour résister au flux sanguin, puis traverser la barrière endothéliale pour se rendre sur le lieu de l'infection [IMHOF & DUNON, 1995]. Ces différents phénomènes mettent en jeu une cascade d'événements contrôlés par l'interaction entre les molécules d'adhérence exprimées par les cellules circulantes et par les cellules endothéliales (figure 8).

Quatre étapes peuvent être distinguées lors de l'adhérence et de la migration trans-endothéliale des leucocytes.

1. Le roulement (*rolling*), étape transitoire où les leucocytes roulent sur les cellules endothéliales. Les molécules impliquées sont les **sélectines**, exprimées à la surface des cellules endothéliales et des leucocytes. Les liaisons établies sont de faible intensité et labiles, mais elles suffisent à freiner les leucocytes qui se mettent à rouler le long de l'endothélium vasculaire.

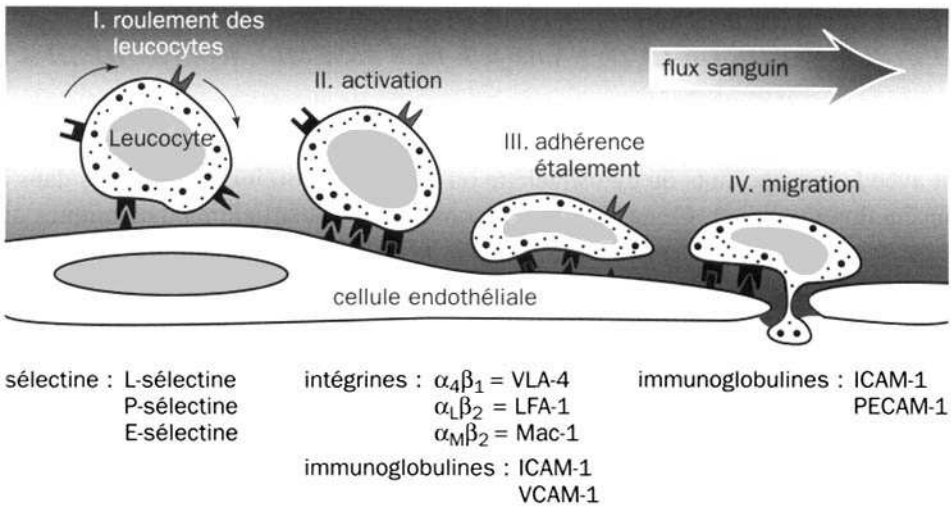


Figure 8 - Interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales. Molécules adhésives impliquées

La diapédèse leucocytaire englobe quatre étapes principales : le roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium, l'activation de certaines molécules adhésives, l'adhérence suivie de l'étalement des leucocytes sur les cellules endothéliales, et enfin la migration trans-endothéliale aux niveaux des jonctions inter-endothéliales, en direction des tissus cibles.

2. L'activation de molécules adhésives. A ce moment de la réponse inflammatoire, des signaux d'activation se mettent en place pour maintenir et prolonger cette réponse. Ceci va entraîner l'activation de intégrines leucocytaires comme $\alpha_L\beta_2$ et $\alpha_M\beta_2$, qui vont changer de conformation et passer d'un état de faible affinité à un état de forte affinité.

3. L'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales qui met en jeu des intégrines leucocytaires (comme LFA-1 et Mac-1) et des molécules de la super-famille des immunoglobulines comme ICAM-1. Cette étape ne peut avoir lieu qu'après l'étape précédente d'activation des intégrines et de leurs ligands. Lors de cette étape, les leucocytes adhèrent fortement à l'endothélium et s'étalent sur les cellules endothéliales. Cette interaction entre les deux types cellulaires active des cascades de signalisation, et ceci aussi bien pour les leucocytes que les cellules endothéliales.

4. L'extravasation, ou migration trans-endothéliale (figure 8) des leucocytes à travers les jonctions intercellulaires des cellules endothéliales, pendant laquelle les leucocytes migrent entre les cellules endothéliales de la paroi vasculaire pour gagner le site infecté. Les jonctions inter-endothéliales jouent bien sûr un rôle important dans la régulation du passage des cellules vers les tissus, mais les mécanismes moléculaires impliqués lors de cette étape sont encore très peu connus. Cette étape fait intervenir d'une part une ouverture des jonctions inter-endothéliales, d'autre part des interactions adhésives entre le leucocyte et les cellules endothéliales.

7. *UTILISATION DES PROTÉINES FLUORESCENTES POUR L'ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DES ASSEMBLAGES ADHÉSIFS*

Les molécules d'adhérence forment souvent des assemblages complexes, que ce soit avec les composants du cytosquelette ou avec des **protéines** impliquées dans la transduction du signal. Ces assemblages constituent des structures dynamiques qui sont difficiles à étudier par les techniques classiques de biochimie ou par des observations en microscopie utilisant des anticorps. Ces dernières années, les techniques de microscopie ont beaucoup évolué et permettent de suivre à l'échelle de la cellule les interactions entre différentes protéines. En particulier, l'utilisation de la GFP (*Green Fluorescent Protein*, protéine fluorescente verte) a connu un essor très important. La GFP, issue d'une méduse, est une protéine qui émet une lumière fluorescente verte, sans avoir d'effet physiologique : on peut ainsi faire produire par une cellule une molécules adhésive fluorescente, en réalisant une construction composée de la GFP fusionnée avec la protéine d'intérêt. On peut ensuite suivre sur cette cellule la localisation de cette protéine, par exemple aux cours de la migration cellulaire. De nombreux dérivés de cette GFP sont à présent disponibles, et on peut ainsi produire des protéines fluorescentes dans différentes couleurs, comme le rouge, le bleu et le jaune. Ceci permet de suivre sur la même cellule plusieurs protéines marquées différemment, et ceci sans trop perturber les interactions des molécules dans la cellule.

8. *CONCLUSION*

En conclusion, les molécules adhésives sont impliquées dans un grand nombre de processus physiologiques et pathologiques, ce qui explique les nombreuses recherches effectuées ces dernières années sur ces molécules. Les retombées dans le domaine de la santé sont importantes, et les domaines dans lesquels ces recherches pourraient déboucher rapidement sur des médicaments sont par exemple l'inflammation, l'athérosclérose, l'ostéoporose et le cancer. Beaucoup de traitements ciblés contre les anomalies de l'adhérence tentent d'inhiber la fixation des molécules adhésives sur la matrice extracellulaire. Par contre, des molécules qui augmenteraient les interactions des cellules avec leur substrat favorisent la cicatrisation en facilitant la migration des cellules d'un tissu sain vers le tissu endommagé. De nombreuses études en recherche fondamentale sont encore nécessaires pour comprendre les mécanismes de l'adhérence cellulaire dans les situations normales et pathologiques. Les progrès les plus rapides proviendront sans doute d'une collaboration pluridisciplinaire, particulièrement entre les biologistes, les chimistes et les physiciens.

RÉFÉRENCES

L.A. CARY & J.L. GUAN - Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front. Biosci.* **4**, D102-13 (1999).

E.A. COX & A. HUTTENLOCHER - Regulation of integrin-mediated adhesion during cell migration. *Microsc. Res. Tech.* **43** (5), 412-419 (1998).

S. DEDHAR & G.E. HANNIGAN - Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8** (5), 657-669 (1996).

R.O. HYNES - Cell adhesion : old and new questions. *Trends Cell Biol.* **9** (12), M33-37 (1999).

B.M. GUMBINER - Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84** (3), 345-357 (1996).

B.A. IMHOF & D. DUNON - Leukocyte migration and adhesion. *Adv. Immunol.* **58**, 345-416 (1995).

G.S. KANSAS - Selectins and their ligands : current concepts and controversies. *Blood* **88** (9), 3259-3287 (1996).

M.P. SHEETZ, D.P. FELSENFELD & C.G. GALBRAITH - Cell migration : regulation of force on extracellular-matrix-integrin complexes. *Trends Cell Biol.* **8**, 51-4 (1998).

S.P. PALACEK, J.C. LOFTUS, M. GINSBERG, D.A. LAUFFENBURGER & A.F. HORWITZ - Integrin-ligand binding properties gowen cell migration speed through cell-substratum adhesiveness. *Nature* **385**, 537-540 (1997).

ANNEXE V-1

AUTO-ORGANISATION BIOLOGIQUE ET STRUCTURES HORS-ÉQUILIBRE : L'EXEMPLE DES MICROTUBULES

James TABONY - Nicolas GLADE

Une des caractéristiques des systèmes vivants est la génération de formes possédant un ordre macroscopique. L'auto-organisation biologique est un problème scientifique important qui demeure mal compris. Est-il possible de rationaliser, en termes de physique et de chimie, le processus selon lequel un objet initialement homogène et sans forme peut spontanément s'auto-organiser pour prendre une forme complexe et avec un haut degré d'organisation macroscopique ? Il y a deux approches physico-chimiques possibles pouvant induire l'auto-organisation : la première est fondée sur les interactions statiques et la physique statistique, la seconde sur les dynamiques chimiques non-linéaires et les phénomènes coopératifs.

Des théoriciens [10] ont prédit que certaines réactions chimiques, quand elles sont suffisamment éloignées de l'équilibre, peuvent montrer des comportements chimiques non-linéaires. Ceci peut conduire une auto-organisation progressive dans l'espace par un couplage de telles réactions avec des processus de transport comme la diffusion (voir annexe chapitre IV). De plus, de tels systèmes peuvent aussi montrer des propriétés de bifurcation et ainsi être dépendants des champs faibles comme la gravité. La présence ou l'absence d'un champ faible à un moment critique du processus d'auto-organisation détermine la morphologie qui va se développer. Ceci a été avancé comme un mécanisme sous-jacent possible pouvant expliquer l'auto-organisation biologique et la formation de motifs (*patterns*). Jusque récemment, il n'y avait pas d'exemples de substances biologiques *in vitro* montrant ce type de comportement (voir chapitre IV, § 4).

Nous avons montré que la formation *in vitro* des **microtubules** à partir de la **tubuline** présente le comportement prévu par ces théories [11]. Ceci est le premier

---

10. A.M. TURING - The chemical basis of morphogenesis. *Phil. Trans. Roy. Soc.* **237**, 37-72 (1952). P. GLANSDORFF & I. PRIGOGINE - *Thermodynamic theory of structure, stability and fluctuations*. Wiley, New York (1971). D. KONDEPUDI - Prigogine, *I. Physica* **107 A**, 1 (1981).

11. J. TABONY & D. JOB - Spatial structures in microtubular solutions requiring a sustained energy source. *Nature* **346**, 448-451 (1990).
J. TABONY & D. JOB - Gravitational symmetry breaking in microtubular dissipative structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 6948-6952 (1992).
J. TABONY - Morphological bifurcations involving reaction-diffusion processes during microtubule formation. *Science* **264**, 245-248 (1994).
C. PAPASEIT, N. POCHON & J. TABONY - Microtubule self-organization is gravity-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 8364-8368 (2000).

exemple d'un système biologique *in vitro* qui s'auto-organise par des processus de réaction-diffusion. Ces préparations s'auto-organisent à une échelle macroscopique et la morphologie qui se forme alors dépend de la présence de la gravité à un moment critique précoce dans le processus d'auto-organisation.

Les microtubules peuvent être formés au laboratoire en chauffant de 4°C à 35°C une solution de tubuline pure en présence d'un **nucléotide**, la guanosine triphosphate (**GTP**). L'assemblage de la tubuline en microtubules dépend de réactions chimiques qui conduisent à l'hydrolyse du GTP en guanosine diphosphate (**GDP**). Ensuite, la réaction se poursuit par des processus chimiques au cours desquels la tubuline s'ajoute préférentiellement à une extrémité du microtubule et se détache de l'autre tandis que le GTP est hydrolysé en GDP. Le système est donc chimiquement irréversible et hors-équilibre et il y a ainsi une consommation et une dissipation d'énergie chimique dans le système. Dans notre cas, l'expérience est effectuée dans des cuves spectrophotométriques (4 cm × 1 cm × 0,1 cm). Une série de stries horizontales, séparées d'environ 0,5 mm, se développe progressivement dans l'échantillon durant 5 heures. La morphologie striée se forme lorsque les microtubules sont assemblés dans des cuves placées verticalement, mais un motif différent, en cercles concentriques, apparaît quand les microtubules sont assemblés dans les cuves placées horizontalement. Une fois formées, les structures sont stables quelle que soit leur orientation par rapport à la gravité (figure AV-1.1).

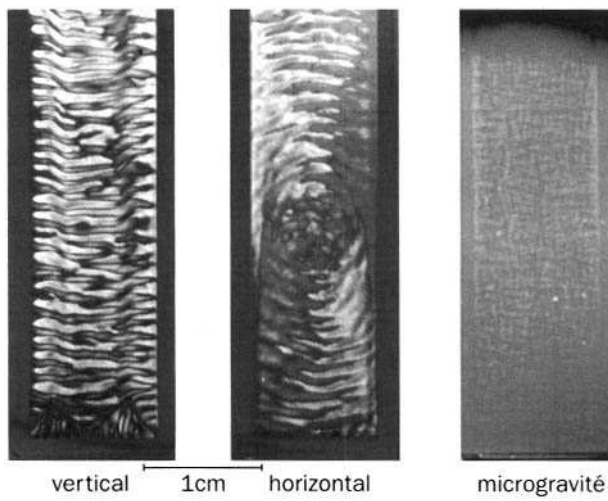


Figure AV-1.1 - Structures microtubulaires auto-organisées formées dans des cuves optiques de 4 cm × 1 cm × 0,1 cm

En présence de gravité (figures de gauche et du centre), la solution s'auto-organise. Une morphologie striée se forme quand les microtubules sont assemblés dans la cuve verticale mais une autre morphologie se forme quand les microtubules sont assemblés dans la cuve restée horizontale. Les processus d'auto-organisation durent environ 5 heures. La morphologie qui se forme dépend de l'orientation de l'échantillon par rapport à la gravité à un moment critique [TABONY, 1994], tôt dans le processus d'auto-organisation et bien avant qu'un motif soit visible. Aucune auto-organisation ne se produit quand des microtubules sont assemblés en absence de gravité (à droite) pendant les 13 premières minutes du processus [PAPASEIT *et al.*, 2000].

Les microtubules s'auto-organisent entre eux parce qu'au cours des processus de croissance-décroissance, ils produisent des traînées chimiques donnant lieu à une auto-organisation d'une manière comparable aux fourmis communiquant et s'organisant entre elles en laissant des traînées de substances chimiques (figure V-A1.2).

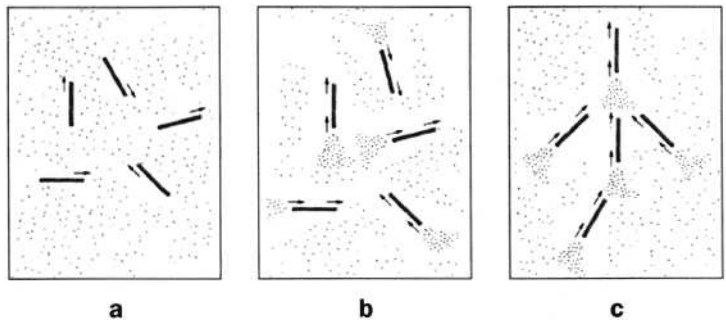


Figure AV-1.2 – Croissance des microtubules
Une des particularités des microtubules est qu'ils croissent d'un côté tandis qu'ils rétrécissent à l'autre extrémité en conservant leur longueur. Il y a donc déplacement des microtubules à une vitesse de plusieurs microns par minute. En avançant, un microtubule libère derrière lui une traînée de forte concentration de tubuline. Puisque les vitesses de réaction augmentent avec la concentration de réactifs, les microtubules voisins vont croître suivant la direction de ces traînées. Les microtubules « parlent » donc entre eux de cette manière.
a - les microtubules viennent juste de se former à partir de la solution de tubuline. Ils sont dans une phase de croissance et ont un arrangement isotrope. **b** - le désassemblage des microtubules à commencé à l'instant de bifurcation. Ceci produit des traînées de tubuline de forte concentration depuis les extrémités décroissantes des microtubules. **c** - les microtubules croissent et se forment préférentiellement dans les traînées de tubuline.

Des simulations numériques fondées sur ce principe prévoient l'auto-organisation des microtubules et sa dépendance vis-à-vis de la gravité (figure AV-1.3).

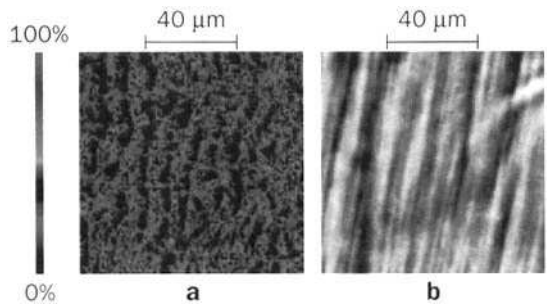


Figure AV-1.3 – Simulations numériques
Des simulations numériques basées sur les principes décrits précédemment donnent lieu à une auto-organisation macroscopique (**a**), comparable à une auto-organisation expérimentale à la même échelle (**b**). Une fois que quelques microtubules ont commencé à prendre une orientation privilégiée, alors les microtubules voisins vont adopter la même orientation. Une fois amorcé, le processus se renforce de lui-même et conduit à l'auto-organisation complète de l'échantillon. N'importe quel petit effet induisant un léger biais directionnel, comme par exemple des vitesses de transport différentes selon les directions verticales ou horizontales, va provoquer l'auto-organisation. La gravité agit ainsi, par son interaction directionnelle, avec les fluctuations de densité macroscopiques présentes dans la solution.

La direction de la gravité brise la symétrie de l'état initialement homogène et provoque l'apparition d'un motif. De tels processus ont pu jouer un rôle dans le développement de la vie sur terre. D'autres facteurs externes comme les champs magnétiques ou électriques, ont pu avoir le même effet. Les processus de ce type pourraient former une classe générale de mécanismes par lesquels les facteurs environnementaux faibles sont transcrits par des systèmes biologiques. La gravité peut donc intervenir dans un processus cellulaire fondamental et ainsi modifier d'autres processus tels que la division cellulaire, qui dépendent à leur tour de l'auto-organisation des microtubules (voir chapitre III).

Des expériences dans l'espace montrent que des processus cellulaires variés sont modifiés quand des cellules sont placées dans des conditions d'apesanteur. Actuellement, il n'y a pas d'explication cohérente à ces observations. Des chercheurs ont observé des modifications de l'organisation du **cytosquelette** et des résultats récents sur les cellules lymphatiques humaines cultivées dans l'espace montrent un réseau désorganisé de microtubules comparé aux expériences à 1 g. Cette observation, conforme à nos résultats, soulève la possibilité que les processus de réaction-diffusion pourraient fournir un mécanisme fondamental pour la dépendance de la fonction cellulaire vis-à-vis de la gravité. Si c'est le cas, cela suggère également que les processus de réaction-diffusion microtubulaires se produisent réellement dans les cellules vivantes. L'organisation des microtubules est essentielle dans la fonction cellulaire (voir § 2.2). Le fait que l'organisation des microtubules dans la cellule soit dépendante de la gravité soulève la question de la viabilité de certaines formes de vie en apesanteur sur des périodes très longues, sans substitut correctif.

Ces résultats montrent comment un système biologique simple, constitué au départ d'une protéine et d'un **nucléotide**, et en l'absence d'ADN, peut se comporter d'une manière complexe. Le comportement global de tels systèmes, parfois surprenant, montre des similitudes avec certains aspects phénoménologiques et morphogéniques des systèmes vivants, comportant un grand nombre de constituants. Il reste à démontrer et à définir le rôle réel de tels mécanismes dans les processus propres à la matière vivante.

Aux origines de la vie, des produits chimiques organiques se sont formés sur terre. Ces molécules se sont ensuite combinées pour donner des produits chimiques plus complexes, comme les **acides nucléiques** et les protéines. Après ce stade, les produits biochimiques actifs ont été confinés dans une membrane constituée d'une bicouche de tensioactifs ayant les dimensions approximatives d'une bactérie ou d'une cellule. Quelque part entre cette étape dans le développement de la vie, et l'apparition des organismes complexes, les processus d'auto-organisation fondés sur des lois physiques et chimiques ont dû se produire. Les processus de réaction-diffusion, comme ceux qui se produisent avec les microtubules, peuvent bien être à l'origine de l'organisation du vivant.

ANNEXE V-2

CARACTÉRISATION DES FORCES DE TRACTION CELLULAIRES

Philippe TRACQUI

Le paragraphe 4 de ce chapitre souligne l'importance des forces de traction cellulaires dans la migration d'une cellule animale. Les forces mécaniques que ces cellules, musculaires ou non, sont capables d'exercer sur et au sein d'un substrat matriciel déformable sont révélées macroscopiquement *in vitro* par la contraction du milieu extracellulaire qui les supporte (gels de **collagène** de différents types, fibrine, Matrigel [12]...). *In vivo*, ces forces de traction sont directement impliquées dans les processus de cicatrisation du derme, où elles assurent une contribution essentielle au rapprochement initial des bords de la plaie chez l'animal et chez l'homme.

Largement utilisés dès 1979 (modèle FPCL (*Fibroblast Populated Collagen Lattice*) [13], les modèles expérimentaux de contraction de biogels restent d'actualité [14] pour caractériser à un niveau macroscopique les forces mécaniques exercées par une population de cellules, ainsi que pour élaborer des tissus de substitution (voir l'encadré *Les substituts tissulaires* du chapitre VI). La contraction de microsphères ou de cylindres de collagène ensemencés de cellules est par exemple quantifié par la diminution progressive du diamètre de l'échantillon [15]. Cette information quantitative reste pourtant extrêmement globale, même si elle permet de suivre les variations de la cinétique de contraction en fonction de différents paramètres expérimentaux (concentration en protéines matricielles, densité cellulaire initiale...). Des approches expérimentales plus récentes, incorporant des jauges de contrainte ou des capteurs de force, ont été élaborées pour mesurer en continu la contraction, généralement quasi-isométrique, du substrat extracellulaire. Dans ces expériences, des cellules (**fibroblastes**, cellules endothéliales...) sont

---

12. Ce type de substrat extracellulaire est supposé être relativement proche par sa constitution, d'une matrice extracellulaire *in vivo*, même si sa composition exacte reste très variable.

13. B. BELL, E. IVARSSON & C. MERRILL - Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl Acad. Sci.* **76**, 1274-1278 (1979).

14. B.A. BROMBEREK, P.A. ENEVER, D.I. SHREIBER, M.D. CALDWELL & R.T. TRANQUILLO - Macrophages influence a competition of contact guidance and chemotaxis for fibroblast alignment in a fibrin gel coculture assay. *Exp. Cell Res.* **275**, 230-242 (2002).

15. R.B. VERNON & M.D. GOODEN - An improved method for the collagen gel contraction assay. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **38**, 97-101 (2002).

cultivées dans un biogel suspendu [16] ou flottant [17] entre deux armatures rigides. L'une de ces armatures est fixe, l'autre étant reliée au capteur de mesure (figure AV-2.1).

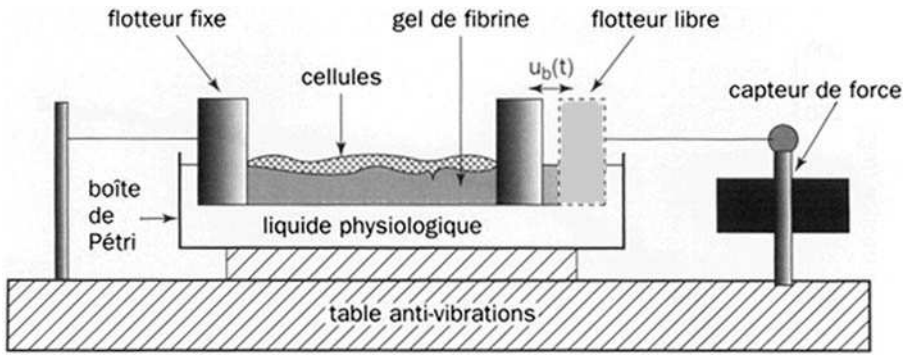


Figure AV-2.1 - Schéma de principe du banc de mesure utilisant un gel flottant

La concentration quasi-isométrique du biogel se traduit par une variation de tension qui, après étalonnage, quantifie l'évolution continue des forces mécaniques exercées par les cellules au sein du biogel. Le même dispositif permet de caractériser le comportement du gel seul sous l'effet de diverses sollicitations mécaniques externes [18]. C'est un avantage essentiel de cette approche qui permet une caractérisation de la contraction en deux étapes :

- ✓ tout d'abord, le comportement rhéologique et les modules mécaniques du biogel sont identifiés,
- ✓ ensuite la courbe de contraction du composite cellules-biogel est utilisée pour quantifier l'amplitude intrinsèque des forces de traction cellulaires (figure AV-2.2).

Ces modèles expérimentaux permettent de quantifier les effets de différents facteurs biologiques sur la dynamique de contraction (type cellulaire, facteurs extracellulaires...) et, réciproquement, de caractériser la réponse macroscopique de cellules soumises à des sollicitations mécaniques imposées (**mécanotransduction**). Parallèlement, l'analyse du comportement viscoélastique non-linéaire de ces matrices biologiques, anisotropes par nature, requiert le développement de modèles théoriques permettant d'identifier leur modules mécaniques caractéristiques. A côté

16. D.I. SHREIBER, P.A. ENEVER & R.T. TRANQUILLO - Effects of pdgf-bb on rat dermal fibroblast behavior in mechanically stressed and unstressed collagen and fibrin gels. *Exp. Cell Res.* **266**, 155-166 (2001).

17. M. KOLODNEY & R.T. WYSOLMERSKY - Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissues cultures : a quantitative study. *J. Cell Biol.* **117**, 73-82 (1992).

18. M. BENKHEROUROU, P.Y. GUMERY, L. TRANQUI & P. TRACQUI - Quantification and macroscopic modelling of the nonlinear viscoelastic behaviour of strained gels with varying fibrin concentrations. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **47**(11), 1465-1475 (2000).

des modèles rhéologiques classiques (modèles de MAXWELL, KELVIN [19]...), différents modèles de milieux multiphasiques sont proposés pour rendre compte non seulement de la rhéologie de la matrice [20], mais également de celle des cellules incluses dans celle-ci [21].

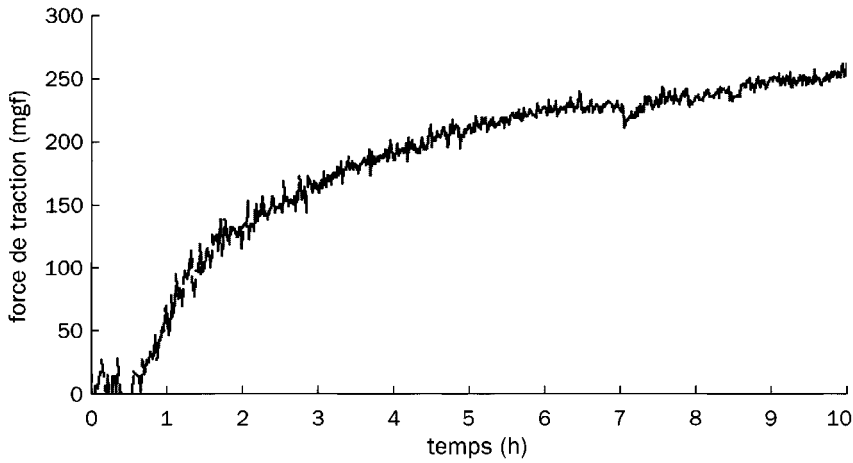


Figure AV-2.2. - Force de traction exercée lors de la contraction d'une matrice de fibrine (1 mg/mL) par 2.10^6 cellules endothéliales de la lignée Eahy 926
(d'après M. BENKHEROUROU, Thèse Université Joseph Fourier, 1999).

Parallèlement à cette approche macroscopique, la caractérisation des forces mécaniques exercées par une cellule isolée a fait l'objet de nombreux travaux théoriques et expérimentaux ces dernières années, en particulier grâce au développement de substrats élastiques adaptés dont on peut contrôler l'élasticité. HARRIS *et al.* ont montré il y a plus de vingt ans [22] que des cellules du derme (**fibroblastes**) produisaient en effet des forces de traction d'amplitude assez élevée pour plisser des feuilles de silicone de quelques microns d'épaisseur. Les plissements générés par les cellules adhérant sur ces supports bidimensionnels déformables matérialisent l'existence et l'orientation des lignes de tension exercées [23].

---

19. Voir par exemple Y.C. FUNG - *Biomechanics, Mechanical properties of living tissues*, 2nd edition. Springer Verlag (1983) .

20. V.H. BAROCAS & R.T. TRANQUILLO - An anisotropic biphasic theory of tissue-equivalent mechanics : the interplay among cell traction, fibrillar network deformation, fibril alignment, and cell contact guidance. *J. Biomech. Eng.* **119**, 137-145 (1997).

21. M.R. ZILE, M.K. COWLES, J.M. BUCKLEY, K. RICHARDSON, B.A. COWLES, C.F. BAICU, G. I.V. COOPER & V. GHARPURAY - Gel stretch method : a new method to measure constitutive properties of cardiac muscle cells. *Am. J. Physiol.* **274,** H2188-202 (1998).

22. A.K. HARRIS, P. WILD & D. STOPAK - Silicone rubber substrata : a new wrinkle in the study of cell locomotion. *Science* **208**, 177-179 (1980).

23. S. MUNEVAR, Y. WANG & M. DEMBO - Traction force microscopy of migrating normal and H-ras transformed 3T3 fibroblasts. *Biophys. J.* **80**, 1744-1757 (2001).

L'observation de ces plissements ne permet généralement qu'une analyse semi-quantitative dont la résolution spatiale et temporelle est limitée. C'est pourtant de cette manière que, de façon originale et audacieuse, BURTON et TAYLOR (1997)[24] ont caractérisé les forces mécaniques mises en jeu au cours de la **cytodiérèse** (voir chapitre III) en se basant sur un étalonnage préalable de la relation force-déformation à partir de la hauteur des plis. D'autres techniques, comme l'inclusion de microbilles dont on suit le déplacement au cours du temps[25], viennent compléter ces observations et permettent, comme le montrent des travaux théoriques récents, de remonter à l'amplitude des forces de traction exercées[26]. L'apport des nanotechnologies a également permis le développement d'approches alternatives où le substrat élastique est remplacé par un tapis solide micro-sensible, présentant à sa surface un maillage d'alvéoles contenant des jauges de contraintes nanométriques, ou par un « tapis de fakir » de micro-poutres verticales qui permettent d'enregistrer les efforts locaux exercés en différents points de la surface basale d'une cellule en déplacement[27].

Mentionnons enfin que le schéma de principe du banc de mesure à deux armatures décrit ci-dessus pour l'étude de populations de cellules se décline également à l'échelle de la cellule individuelle. THOUMINE et OTT (1997)[28] ont ainsi piégé une cellule isolée entre une microplaque rigide et une autre flexible. Cette dernière, préalablement calibrée, joue le rôle d'un capteur de force. Ce dispositif permet de mesurer la force de traction exercée par une cellule isolée (de l'ordre de 40 nN pour un fibroblaste[28]). Ce même dispositif permet de quantifier l'adhésion d'une cellule à un substrat protéique préalablement déposé sur l'une des microplaques.

Au-delà de la caractérisation des forces mécaniques intrinsèques exercées par les cellules, c'est plus globalement le contrôle de l'adhésion cellulaire et du remodelage du cytosquelette par des contraintes mécaniques qui font l'objet de recherches actuelles. Dans un travail récent, BALABAN *et al.* (2001)[29] ont montré que la surface des **plaques d'adhérence focale** (voir chapitre V, § 3.2.2) augmentait avec

---

24. K. BURTON & D.L. TAYLOR - Traction forces of cytokinesis measured with optically modified substrata. *Nature* **385**, 450-454 (1997).

25. M. DEMBO & Y.L. WANG - Stresses at the cell-to-substrate interface during locomotion of fibroblasts. *Biophys.* **76**, 2307-2316 (1999).

26. J.P. BUTLER, I.M. TOLIC-NORRELYKKE, V. FABRY & J.J. FREDBERG - Traction fields, moments, and strain energy that cells exert on their surroundings. *Am. J. Physiol.* **282**, C595-605 (2002).

27. C.G. GALBRAITH & M.P. SHEETZ - A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 9114-9118 (1997).
J.L. TAN, J. TIEN, D. M. PIRONE, D.S. GRAY, K. BHADRIRAJU & C.S. CHEN - Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* **100** (4), 1484-1489 (2003).

28. O. THOUMINE & A. OTT - Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J. Cell Sci.* **110**, 2109-2116 (1997).

29. N.Q. BALABAN, U.S. SCHWARZ, D. RIVELINE, P. GOICHBERG, G. TZUR, I. SABANAY, D. MAHALU, S. SAFRAN, A. BERSHADSKY, L. ADDADI & B. GEIGER - Force and focal adhesion assembly : a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* **3**, 466-472 (2001).

l'intensité de la force qui leur était transmise de façon centripète. On peut espérer que dans un avenir proche, le développement de marqueurs fluorescents vitaux sensibles aux efforts mécaniques permettra de compléter cette étude sur le rôle des forces mécaniques dans la régulation des processus biomécaniques successifs mis en œuvre dans la migration cellulaire [30] (voir chapitre V, § 4.5), ainsi que dans le contrôle de l'expression des différents gènes qui contrôlent la dynamique cellulaire.

30. Le cycle d'événements biomécaniques impliqués dans la migration est habituellement décomposé en cinq étapes : protrusion, adhésion, traction, dé-adhésion, translocation [voir par exemple SHEETZ *et al.*, *Biochem. Soc. Symp.* **65**, 233-243 (1999)].

ANNEXE V-3

LES MOTEURS MOLÉCULAIRES

Alain DUPERRAY

Le mouvement est une des caractéristiques de la vie, et la plupart des mouvements biologiques sont accomplis grâce à des **protéines** appelées moteurs moléculaires. Il existe une grande diversité de ces moteurs moléculaires, mais ils ont tous en commun le fait de convertir l'énergie chimique de la cellule (l'ATP), en énergie mécanique. L'hydrolyse de l'ATP produit un changement de conformation qui aboutit à un mouvement unidirectionnel. Les moteurs moléculaires les plus connus sont sans doute ceux qui utilisent les fibres du cytosquelette pour se mouvoir. On en connaît trois superfamilles dont les prototypes sont la myosine, qui interagit avec les filaments d'actine, et deux moteurs associés aux microtubules, la **dynéine** et la **kinésine**. Tous trois possèdent un domaine moteur catalytique, avec un site de fixation pour l'ATP et un site qui permet l'interaction avec le cytosquelette. Les études cristallographiques des domaines moteurs montrent que les trois protéines ont de fortes homologies structurales. Les autres domaines de ces protéines diffèrent considérablement, ce qui suggère qu'ils sont, au moins en partie, responsables de la diversité fonctionnelle de ces trois classes de moteurs.

Les moteurs moléculaires associés aux microtubules sont impliqués dans le transport intracellulaire et la motilité cellulaire. Ils sont utilisés dans de très nombreux processus cellulaires, dont le transport des organelles associées aux membranes, des assemblages de protéines et des ARN messagers, mais interviennent aussi dans la dynamique des microtubules, la division cellulaire et le développement embryonnaire.

La kinésine [31] est une protéine tétramérique composée de deux chaînes lourdes de 120 kDa, caractérisées par la présence d'un domaine moteur qui interagit avec les microtubules et possède l'activité ATPasique, et de deux chaînes légères de 62 kDa, qui se lient avec les constituants cellulaires à transporter. Les observations et des essais fonctionnels ont montré que la kinésine se déplace vers l'extrémité (+) du **microtubule** et est donc impliquée dans le transport antérograde des organelles. La vitesse de glissement d'une molécule de kinésine sur un microtubule varie de 0,5 à 3 µm/seconde, une vitesse relativement importante à l'échelle d'une cellule de 20 µm. L'interaction d'une molécule de kinésine avec le microtubule persiste

31. N. HIROKAWA - Kinesin and Dynein Superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* **279**, 519-26 (1998).

pendant un temps assez long, permettant à une seule molécule d'effectuer son transport sur plusieurs micromètres.

La dynéine [32] comprend deux chaînes lourdes de 530 **kDa**, trois chaînes intermédiaires de 74 kDa et quatre chaînes légères de 60 kDa. Contrairement à la kinésine, la dynéine se déplace vers l'extrémité (–) du microtubule et est donc impliquée dans le transport de la périphérie de la cellule vers le centre.

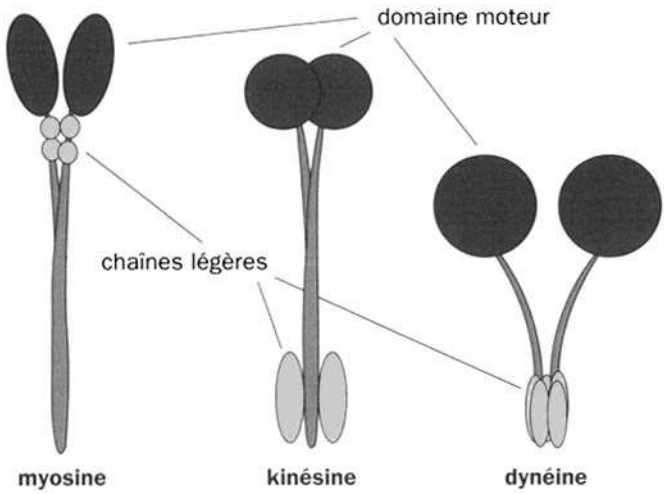


Figure AV-3 - Schéma des trois prototypes de moteurs moléculaires
Les trois moteurs sont formés de deux chaînes lourdes formant le domaine catalytique moteur, suivi d'un domaine allongé en forme de tige. Les chaînes légères associées sont représentées en gris plus clair.

La **myosine** est très connue pour son rôle dans la contraction musculaire, lorsqu'elle interagit avec l'actine. Les myofibrilles, éléments contractiles de la cellule musculaire, sont composées d'assemblages répétés de filaments minces et de filaments épais, qui glissent les uns sur les autres lors de la contraction. Les filaments minces sont formés principalement d'actine, alors que les filaments épais sont formés par l'assemblage des queues de myosine, dont les têtes pointent vers les filaments d'actine. La myosine musculaire ou myosine II est formée de deux chaînes lourdes de 200 kDa et de quatre chaînes légères, de deux types différents, de 17 et 19 kDa. L'interaction des têtes de myosine avec l'**ATP** entraîne leur détachement des filaments d'actine. L'ATP est ensuite hydrolysé, ce qui entraîne un changement de conformation de la myosine, qui se déplace alors de 5 nm vers l'extrémité (+) du filament d'actine. La myosine peut alors se fixer à l'actine, relarguer son ADP et retrouver sa conformation initiale, entraînant un déplacement relatif des deux filaments. Chaque filament épais porte environ 500 têtes de myosine, qui chacune peuvent effectuer jusqu'à 5 cycles par seconde. On voit que

32. G. WOEHLKE, M.O. SCHLIWA - Walking on two heads : the many talents of kinesin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 50-58 (2000).

contrairement à la kinésine, la myosine se détache de l'actine à chaque cycle, et une seule molécule ne peut donc pas produire de mouvement ; c'est la coopération des nombreuses têtes de myosine pouvant interagir avec le filament d'actine qui provoque un glissement des filaments à des vitesses allant jusqu'à 15 µm par seconde. La myosine est également importante dans les cellules non musculaires, car en interagissant avec des réseaux locaux d'actine, elle intervient dans les phénomènes de migration cellulaire, ou dans la formation de l'anneau contractile au cours de la **cytodiérèse**, avant la séparation des deux cellules filles lors de la division cellulaire (voir chapitre III). Enfin, les formes non conventionnelles de **myosine** que l'on trouve associées aux membranes sont impliquées dans le trafic membranaire.

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

Chapitre VI

MATRICES EXTRACELLULAIRES
ANALOGUES BIOLOGIQUES DE CRISTAUX LIQUIDES

Marie Madeleine GIRAUD GUILLE

1. INTRODUCTION

Le terme général de matrice extracellulaire (MEC) désigne l'ensemble des macromolécules sécrétées localement dans l'espace extracellulaire de la plupart des tissus. Cette matrice est organisée en réseaux plus ou moins compacts et ordonnés, qui occupent un volume important dans les **tissus conjonctifs** tels le derme ou les tendons ; elle forme parfois des structures hautement spécialisées et minéralisées, comme dans l'os (voir annexe IV, § A2.2).

On a longtemps considéré la MEC comme un tissu de remplissage jouant un rôle passif de cohésion entre les cellules ; son influence dans le comportement des cellules, forme, adhésion, multiplication ou migration (voir chapitre V) a été démontrée à partir des années 1960, en relation avec le développement des techniques de culture cellulaire. La structure et la fonction des principales macromolécules des MEC seront d'abord introduites, puis le rôle de ces compartiments dans la vie des organismes pluricellulaires sera ensuite abordé, avec quelques exemples d'interrelations matrices-cellules. La question de l'assemblage tridimensionnel des macromolécules de structure des MEC sera enfin abordée.

De nombreuses avancées dans la compréhension des assemblages, supramoléculaires ou suprafibrillaires, rencontrés dans les matrices extracellulaires sont issues de collaborations avec les physiciens de la matière condensée. En particulier l'existence d'états cristallins liquides stabilisés dans les MEC a permis d'interpréter, à partir de modèles décrits en physique des solides, les architectures supramoléculaires complexes rencontrées dans ces tissus. Cela a également permis de reproduire expérimentalement des systèmes ordonnés, fluides ou stabilisés, mimant les structures rencontrées dans les tissus biologiques.

2. *UN RÉSEAU COMPLEXE DE MACROMOLÉCULES*

Trois grands types de macromolécules sont synthétisées par les cellules de la MEC. Des fibres de nature protéique formant des édifices rigides ou élastiques : le **collagène** et **l'élastine** ; des glycoprotéines, impliquées dans l'adhésion des cellules à leur substrat : par exemple la **fibronectine** et la **laminine** ; des polysaccharides, constituant des gels hydratés à fonction mécanique : les **glycosaminoglycanes** et les **protéoglycanes**.

2.1. LES COLLAGÈNES

Les collagènes, principales **protéines** de la MEC, jouent un rôle structural essentiel à l'échelle des tissus et des organismes. Elles représentent 25% des protéines totales des vertébrés, une vingtaine de types sont actuellement décrits, formant des structures en fibrilles ou en réseaux. Les molécules sont caractérisées par leurs séquences répétitives en acides aminés de type **glycine** (un résidu sur trois) et leur richesse en **proline**, **hydroxylysine** et **hydroxyproline**. Le collagène de type I, le plus abondant, est le constituant principal de la peau, des os, des tendons, de la cornée. L'entité moléculaire de base est constituée par trois chaînes polypeptidiques en hélices, de poids moléculaire 100 000 **daltons** environ. Ces triples hélices de 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre s'assemblent dans la matrice extracellulaire en fibrilles dont le diamètre varie de 50 à 300 nm selon les tissus concernés. Le décalage périodique régulier des triples hélices au sein des fibrilles aboutit à une striation périodique transversale, répétitive tous les 67 nm qui est bien visible en microscopie électronique à transmission (figure 1).

Cette périodicité transversale permet de caractériser, sur coupes ultrafines, les fibrilles de collagène au sein des tissus, ou dans des substituts tissulaires reconstitués à base de collagène. La résistance à la tension des fibrilles de collagène est augmentée par l'établissement de ponts intermoléculaires sous forme de liaisons covalentes établies entre des résidus lysine portant des groupements aldéhydes. Le pontage transversal est localisé essentiellement au niveau des extrémités non hélicoïdales des molécules.

La biosynthèse du collagène par les **fibroblastes**, cellules fusiformes du tissu conjonctif, débute au niveau du réticulum endoplasmique (voir chapitre I) où sont assemblées les chaînes α ; elles sont secondairement hydroxylées et glycosylées au niveau des vésicules de l'appareil de golgi, lieu également de la formation de la triple hélice. Les extrémités N- et C- terminales non hélicoïdales des triple hélices sont clivées, par des enzymes spécifiques localisées dans la matrice extracellulaire, lors de la sécrétion des molécules hors de la cellule. La fibrillogenèse a ainsi lieu dans la MEC ou les fibrilles forment des ordres plus ou moins réguliers à grande distance. Dans les MEC denses, les orientations fibrillaires se répètent au niveau de plans successifs, selon divers types de contreplaqués. Au niveau de chaque plan,

l'ordre des fibrilles peut être aléatoire ; il peut, entre deux plans successifs, suivre deux directions alternées selon des angles proches de 90° ; il peut également varier régulièrement de direction, d'un plan au suivant, selon des angles variables (voir § 4.1).

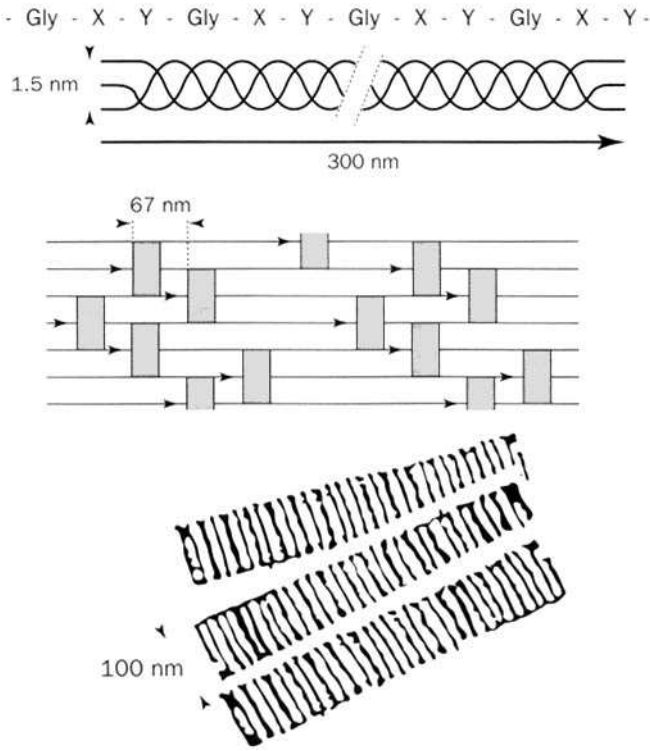


Figure 1 - Hiérarchies structurales du collagène de type I
La protéine est constituée par trois chaînes α, dont un acide aminé sur trois est une glycine. Ces chaînes s'enroulent pour former une triple hélice de collagène de 300 nm de long. Les molécules de collagène s'assemblent spontanément dans l'espace extracellulaire, en fibrilles. Elles sont caractérisées en ultrastructure par la présence d'une striation périodique transversale.

Le collagène est renouvelé en permanence dans les tissus. Il est dégradé par les **collagénases**, sécrétées par les fibroblastes présents dans la MEC mais aussi par les **macrophages** et les polynucléaires d'origine sanguine.

2.2. LES FIBRES ÉLASTIQUES

Ces fibres, visibles en microscopie photonique, sont abondantes dans les tissus dont la taille et la forme varient, comme la peau, les poumons, les vaisseaux sanguins. Elles permettent aux tissus de retrouver leur forme après un étirement transitoire.

Le principal constituant des fibres élastiques est une protéine très hydrophobe l'**élastine** riche en proline et en glycine. Longue d'environ 750 acides aminés, la molécule est formée par l'alternance de segments hydrophobes et d'**hélices α** riches en lysine et en alanine. Les molécules se lient entre elles par des liaisons covalentes, en formant un réseau tridimensionnel élastique (figure 2).

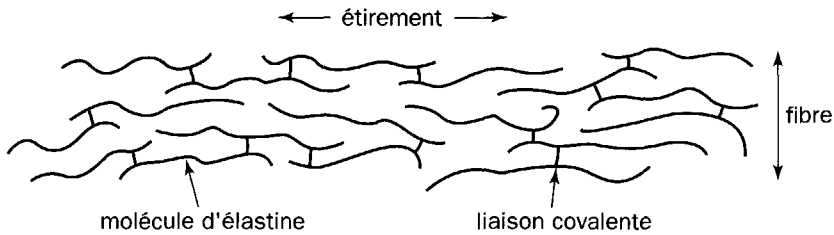


Figure 2 - Réseau de molécules d'élastine sous étirement
Les molécules, liées à leurs voisines par des liaisons stables, forment des fibres qui apparaissent ici sous forme étirée. En l'absence de tension, des repliements aléatoires se forment et la fibre adopte alors un état relâché (dessin inspiré de ALBERTS *et al.*, 1994).

Les fibres élastiques sont constituées d'un cœur d'élastine, qui apparaît en microscopie électronique à transmission sous forme de matériel amorphe, entouré de glycoprotéines, visibles sous forme de microfibrilles de 10 nm de diamètre.

Synthétisées par les fibroblastes, les fibres élastiques établissent des liaisons avec le collagène et les polysaccharides de la MEC. Cet entrelacement limite l'étirement du réseau élastique, évitant les déchirures des tissus très déformables. Elles sont dégradées par une enzyme, l'élastase sécrétée dans la matrice par les macrophages et les polynucléaires.

2.3. LES GLYCOPROTÉINES

Les **glycoprotéines** interviennent dans les phénomènes d'adhésion cellulaire (voir chapitre V). Les mieux connues sont la fibronectine, abondante dans les tissus conjonctifs, qui assure l'adhésion des fibroblastes à la matrice et la **laminine**, spécifique des tissus de revêtement, qui permet l'adhésion des cellules épithéliales à la **lame basale**.

La fibronectine est un dimère de 100 nm de long dont les deux chaînes, longues d'environ 2500 acides aminés, sont reliées par des ponts disulfures (figure 3).

Des sites de liaison avec le collagène sont présents sur le dimère et des séquences spécifiques de trois acides aminés (arginine, glycine, acide aspartique), dites séquences RGD, sont reconnues spécifiquement par des récepteurs de la surface cellulaire, les **intégrines** (voir chapitre V, § 1.2). La fibronectine de la MEC joue un rôle déterminant dans le développement embryonnaire, comme le démontrent des expériences où sont inactivées les gènes codant pour cette protéine. Les souris de laboratoire, correspondant à ce modèle expérimental, sont qualifiées de souris

« *knock out* ». Les embryons mutés présentent alors des défauts au niveau de la migration cellulaire entraînant des anomalies morphologiques et une mort rapide.

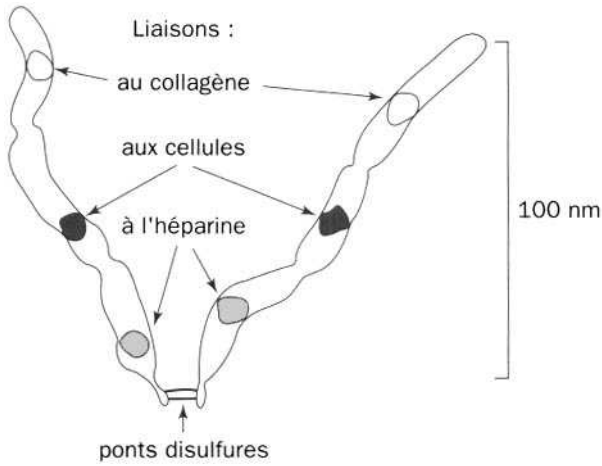


Figure 3 - Structure de la fibronectine
Cette protéine extracellulaire, favorisant l'attachement des cellules à la matrice, est formée de deux chaînes polypeptidiques de séquences voisines, reliées par des ponts disulfures. Elle est constituée par plusieurs domaines présentant des sites de liaison spécifiques soit à une molécule, soit à une cellule (dessin inspiré de ALBERTS *et al.*, 1994).

Il existe une fibronectine plasmatique, synthétisée par les **fibroblastes** et les cellules hépatiques, et qui, véhiculée par le sang, active la coagulation sanguine et la cicatrisation.

Une autre glycoprotéine, la **laminine**, est localisée exclusivement au niveau des lames basales, c'est-à-dire dans le périmètre immédiat des cellules de type épithélial, adipeux, musculaire et nerveux. Les fonctions des lames basales sont diverses, elles servent de filtres moléculaires au niveau des cellules rénales ; elles interviennent aussi dans la régénération neuromusculaire au niveau des synapses. Longue de 100 nm, la laminine possède des sites de liaison avec le collagène de type IV, le seul collagène présent dans les lames basales, et avec les intégrines, récepteurs de la **membrane plasmique** des cellules.

2.4. LES POLYSACCHARIDES

Les **glycosaminoglycanes** (GAG) sont constitués de chaînes non ramifiées de polysaccharides. Leur structure générale est essentiellement une séquences répétée de disaccharides, dont un des sucres est aminé, le plus souvent sulfaté. Le plus simple des GAG est l'**acide hyaluronique**, abondant dans les tissus embryonnaires, il facilite la migration des cellules au cours du développement embryonnaire. Les GAG, en raison de leur richesse en charges négatives, piègent les molécules d'eau en formant des gels gonflés et visqueux remplissant la plus grande

partie de l'espace extracellulaire. Ces gels hydratés fournissent un support mécanique aux tissus et permettent la diffusion rapide de molécules hydrosolubles.

A l'exception de l'acide hyaluronique, les GAG sont tous reliés de façon covalente à un axe protéique pour former des **protéoglycanes**. Une exemple typique est l'agrécane, composant majeur du cartilage. Son poids moléculaire est de 3.10^6 daltons, il possède plus de 100 chaînes de GAG (1 pour 20 acides aminés) (figure 4a). De nombreux protéoglycanes sont plus petits, la décorine, sécrétée par les **fibroblastes**, ne possède qu'une seule chaîne de GAG (figure 4b). Elle décore la surface des fibrilles de collagène.

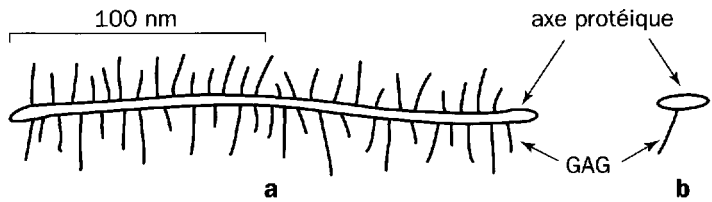


Figure 4 - Deux protéoglycanes, l'agrécane (a) et la décorine (b)
Les protéoglycanes sont constituées d'un axe protéique auquel s'attachent des chaînes glucidiques latérales. L'agrécane, composant majeur du cartilage, comprend plus de 100 chaînes de GAG ; la décorine, présente à la surface des fibrilles de collagène, ne comprend qu'une seule chaîne latérale (dessin inspiré de ALBERTS *et al.*, 1994).

La diversité des protéoglycanes aboutit à des gels présentant une grande hétérogénéité dans la taille des pores et des densités de charges qui contrôlent la circulation de molécules et de cellules au sein de l'espace extracellulaire.

Deux polysaccharides jouent un rôle structural essentiel au niveau des MEC. Il s'agit de la **cellulose**, localisée dans les parois végétales, et la **chitine**, présente essentiellement dans le squelette externe des arthropodes et la paroi des champignons. Ces macromolécules sont constituées de longues chaînes de polymères de glucose, acétylées et aminées pour la chitine. Les chaînes s'assemblent, grâce à des liaisons hydrogène, en bâtonnets ordonnées de quelques nm de diamètre, apellés cristallites. Les cristallites s'associent de manière covalente à des protéines pour former des fibrilles de 10 nm de diamètre ou plus. Nous verrons que l'ordre à grande distance adopté par les cristallites de chitine ou de cellulose dans les matrices extracellulaires est souvent analogue à celui formé par les fibrilles de collagène et correspond à des géométries de phases cristallines liquides. Ces deux polysaccharides extracellulaires, très abondants en terme de biomasse, sont actuellement valorisés au niveau industriel en tant que polymères d'origine naturelle.

3. *RÔLE DES MATRICES EXTRACELLULAIRES ET RELATIONS AVEC LES CELLULES*

3.1. FORME, PROTECTION, LOCOMOTION

Au cours de l'évolution, le développement des organismes pluricellulaires a été directement lié à la présence d'une MEC, permettant l'association de cellules en tissus, puis de tissus en organes. Cette charpente architecturale donne ainsi sa forme aux individus et en l'absence de ces réseaux extracellulaires les espèces tant animales que végétales ne seraient qu'un simple amas de cellules. La morphogenèse, qui étudie le développement et la différenciation des organismes depuis une cellule initiale jusqu'au stade adulte (voir chapitre IV), doit aussi expliquer le déterminisme de la mise en place des MEC qui conditionnent les formes du vivant.

Les MEC confèrent résistance et rigidité à des tissus qui jouent alors un rôle de protection des organismes, lorsqu'ils sont présents à l'interface avec le milieu extérieur. Certaines parois végétales, les coquilles de mollusques, les carapaces de crustacés, sont des exemples de matrices extracellulaires où un réseau de macromolécules organiques, déposé en premier, interagit avec un réseau minéral, le plus souvent à base de cristaux de calcium, de phosphate ou de silice.

La présence de MEC calcifiées intervient également dans la locomotion en apportant un squelette rigide permettant le déplacement des organismes. Ce squelette peut être externe, comme dans la carapace de crustacés, ou interne, dans les tissus osseux des vertébrés. De manière plus générale, les macromolécules des MEC participent aux propriétés mécaniques des tissus, assurant une résistance aux forces de traction (voir annexe V-2), c'est le cas du collagène, ou une résistance aux forces de compression, rôle joué par les GAGs.

3.2. RELATIONS CELLULES-MATRICES

3.2.1. Adhésion des cellules à la matrice

Les relations cellules-matrices mettent en jeu des phénomènes complexes faisant intervenir l'ancrage des cellules à leur support (voir chapitre V). Des protéines transmembranaires, les **intégrines**, jouent un rôle central dans l'adhésion des cellules à leur environnement extracellulaire. Ces protéines interagissent avec les principales protéines de la MEC, à savoir le collagène, la fibronectine et la laminine, en établissant des liaisons faibles mais multiples permettant aux cellules d'explorer leur environnement tout en maintenant des sites d'adhérences à la matrice. L'ancrage des cellules à la MEC joue un rôle dans la différenciation des cellules du **tissu conjonctif** en modifiant leur forme et leur phénotype. Des résultats nombreux montrent par exemple qu'en fonction de leurs conditions de culture, les **chondrocytes**, cellules arrondies du cartilage produisant du collagène

de type II, se différencient en cellules allongées de type fibroblaste, produisant du collagène de type I. La forme arrondie des chondrocytes disparaît lorsque la densité en cellules de la culture diminue. Dans ce cas, les cellules s'aplatissent en formant des monocouches sur la boite de Pétri (figure 5). Si les cellules sont replacées dans un contexte tridimensionnel, elles retrouvent alors leur forme et leurs propriétés de synthèse initiales.

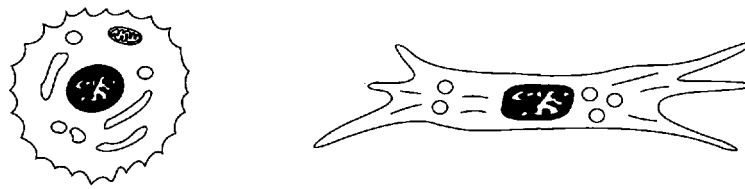


Figure 5 - Interconversions chondrocytes-fibroblastes
En fonction des conditions de culture, les cellules du cartilage ont un ancrage différent à la matrice ; elles changent de forme et modifient leurs produits de synthèse.

Le phénotype de cellules en culture peut ainsi varier en fonction de leur attachement à la MEC, mécanisme qui met en jeu des récepteurs présents au niveau de la **membrane plasmique** (voir chapitre V). Les biologistes cellulaires tentent actuellement de comprendre comment des interactions entre la matrice et le **cytosquelette** d'**actine**, par l'intermédiaire des intégrines, activent les voies de signalisation intracellulaires (voir chapitre V, § 5). Ces cascades de signalisation mettent en jeu des systèmes de régulation qui contrôlent l'expression des gènes.

3.2.2. Comportement de fibroblastes en culture

Des expériences concluantes de culture cellulaire démontrent que les cellules interagissent avec le collagène, protéine fibrillaire qu'elles sécrètent *in vivo* et qui les entoure :

- ✓ Deux fragments de tissu embryonnaire, contenant des fibroblastes, sont espacés de plusieurs millimètres sur un gel de collagène. Les fibrilles constituant le gel, ne présentent au départ aucun ordre, puis une réorganisation du gel apparaît. Les fibrilles de collagène, sensibles aux tensions crées par les cellules, s'alignent en faisceaux parallèles entre les deux explants.
- ✓ Des fibroblastes sont mélangés, dans une boîte de culture, à un gel de collagène constitué d'un réseau lâche de fibrilles. Une contraction très importante s'observe dans les 24 heures qui suivent le mélange, allant jusqu'à une réduction de 60% du volume initial du gel. Ce phénomène est directement lié à la présence des cellules puisque leur mort, par choc osmotique, supprime la contraction (voir l'encadré *Les substituts tissulaires*).
- ✓ Des fibroblastes sont placés sur un gel de collagène dont les fibrilles sont orientées de manière unidirectionnelle ; les cellules migrent en suivant la direction des fibrilles.

Ces diverses expériences mettent en évidence les interactions dynamiques réciproques entre architecture extracellulaire et dynamique cellulaire : les fibroblastes peuvent orienter localement les fibrilles de collagène environnantes tandis que celles-ci, à leur tour, interviennent dans la migration de ces cellules.

4. ASSEMBLAGE DE MACROMOLÉCULES DE STRUCTURE

4.1. ASSEMBLAGE ORDONNÉ DANS LES TISSUS

Les fibrilles de collagène et les cristallites de chitine ou de cellulose, principaux composants structuraux des **tissus conjonctifs**, forment au niveau extracellulaire des trames souvent très denses présentant des géométries en « contreplaqués biologiques ». Ce terme désigne une géométrie où des couches successives sont superposées en strates parallèles ; l'arrangement des fibrilles au niveau de chaque couche peut être aléatoire ou plus ou moins ordonné.

Dans les organisations simples, les fibrilles organiques restent parallèles entre elles dans une direction donnée. On retrouve par exemple ces arrangements avec le collagène au niveau des tendons de vertébrés ou avec la chitine dans certaines régions des cuticules d'insecte. Dans d'autres architectures, les fibrilles organiques s'organisent selon deux directions alternées qui se croisent pratiquement à angle droit. C'est le cas de la cellulose dans des parois cellulaires d'algues, du collagène dans le tégument de vers, dans les écailles de poisson, dans la cornée ou au niveau de l'os compact.

Une architecture fréquemment rencontrée dans les MEC correspond à des systèmes multidirectionnels dénommés « contreplaqués torsadés » dont la géométrie est décrite dans le modèle pyramidal (figure 6). Ce modèle est constitué d'une série de plans parallèles de taille décroissante. Au niveau de chaque plan les droites dessinées représentent l'orientation des molécules ou des fibrilles, elles sont toutes parallèles entre elles dans un même plan et tournent d'un angle petit et constant d'un plan au suivant. Une périodicité, P, est définie par la rotation de 360° des orientations moléculaires. Sur les faces obliques du modèle apparaissent des séries d'arceaux emboîtés, superposées en strates parallèles. Chaque série d'arceaux correspond à une rotation de 180° des orientations moléculaires, donc à une rotation de P/2.

Ce modèle architectural se retrouve dans de nombreuses MEC : dans le tégument, tissu protecteur des invertébrés, comme les cuticules d'arthropodes ou d'annélides ; dans les membranes protectrices d'œufs d'origines diverses, nématodes, insectes, poissons ; dans une grande variété d'espèces et de tissus végétaux ; dans des tissus squelettiques de type écaille ou os chez les vertébrés (voir figure 7).

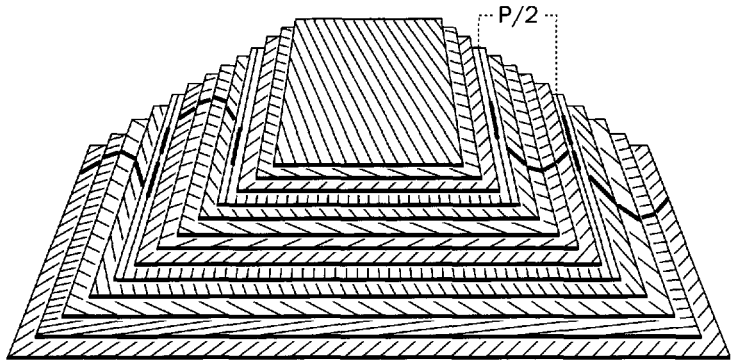


Figure 6 - Modèle en contreplaqué torsadé
Une série de cartes superposées, de taille croissante, forment une pyramide ; sur chacune des cartes sont dessinées des droites parallèles indiquant les orientations moléculaires. Les variations régulières des orientations moléculaires, d'un plan au suivant, dessinent des séries d'arceaux sur les faces obliques du modèle.

Le modèle en contreplaqué torsadé s'observe sur des centaines de µm et selon une disposition planaire dans les parois végétales ou les cuticules de crustacés. Il apparaît selon des modalités cylindriques dans le tissu osseux ; la trame organique de l'os compact est constituée par des entités de base appelées ostéones qui sont de petits cylindres de 0,2 mm de diamètre, constituées de lamelles coaxiales. Les fibrilles de collagène sont parallèles entre elles au niveau d'une lamelle, mais leur direction tourne régulièrement d'une lamelle à la suivante.

4.2. ANALOGUES BIOLOGIQUES DES CRISTAUX LIQUIDES

Des travaux débutés dans les années 1970 ont montré que l'agencement tridimensionnel des macromolécules de structure au niveau des matrices extracellulaires obéit à des assemblages de type cristallin liquide.

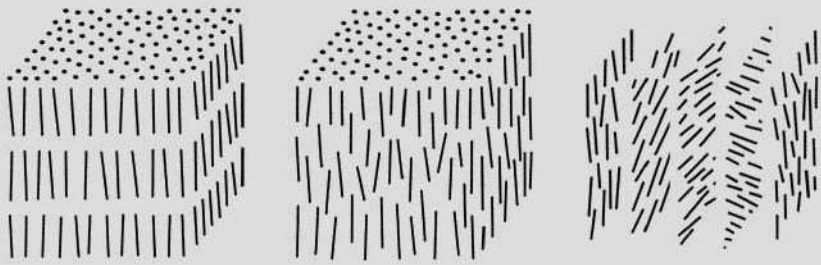
Dans les **cristaux liquides** l'organisation des molécules en bâtonnets est intermédiaire entre celle d'un fluide désordonné isotrope et celle d'un cristal ordonné dans les trois directions de l'espace. Les trois principaux mode d'arrangement, classiquement décrits par les physiciens, sont les phases nématiques, smectiques et cholestériques (voir encadré *Les cristaux liquides*). Le modèle cholestérique est celui retrouvé dans les MEC formant des édifices en contreplaqués torsadés.

Dans les analogues biologiques de cristaux liquides, ce sont les entités macromoléculaires complexes, les fibrilles de diamètre supérieur au nanomètre, qui sont ordonnées selon ces mêmes modèles : fibrilles de collagène ou cristallites de chitine ou de cellulose. Le caractère liquide ou visqueux est présent initialement lors du passage des macromolécules hors de la cellule. La structure cristalline liquide est ensuite stabilisée par l'établissement de liaisons intermoléculaires entre macromolécules organiques ou par le développement d'un réseau minéral au sein de la phase organique.

Les cristaux liquides

Les cristaux liquides ou *mésophases* sont des états intermédiaires de la matière, présentant à la fois l'écoulement d'un liquide et les propriétés optiques liées à l'anisotropie du milieu. Les molécules en bâtonnets, présentent un rapport longueur sur diamètre (L/D) souvent proche de 20 ; elles sont mobiles et s'orientent dans une, deux ou trois directions de l'espace. Les phases cristallines liquides apparaissant dans des systèmes chimiques purs sont dits *thermotropes*, l'ordre est dépendant de la température ; celles qui apparaissent dans des systèmes mixtes sont dites *lyotropes*, l'ordre est dépendant de la concentration. Ce dernier cas est celui rencontré dans les systèmes biologiques.

Les cristaux liquides sont caractérisés en lumière polarisée par l'analyse de leurs textures ou par diffraction de rayons X. FRIEDEL, en 1922, à partir d'observations microscopiques, a classé trois principaux types d'organisations rencontrées avec des molécules en bâtonnets : les phases *smectiques, nématiques et cholestériques*.



a - Dans un smectique les molécules, toutes parallèles, forment des couches d'égale épaisseur ; les molécules normales ou obliques aux couches, diffusent librement dans une direction latérale.
b - Dans un nématique les molécules sont toutes parallèles, avec leurs centres de gravité disposés de manière aléatoire ; l'ordre est orientationnel, les molécules se déplacent selon leur axe longitudinal.
c - Dans un cholestérique, qui dérive d'un ordre nématique, les molécules sont parallèles dans des plans (en réalité fictifs) et leur direction tourne d'un angle petit et constant, d'un plan au suivant.

De nombreuses macromolécules biologiques – protéines, acides nucléiques, polysaccharides – peuvent former des organisations supramoléculaires proches d'états cristallins liquides. Ces systèmes ne forment pas des solutions mais des colloïdes formant soit des sols, soit des gel plus ou moins denses, éventuellement stabilisés. Les analogues biologiques des cristaux liquides sont des systèmes qui possèdent les géométries décrites dans les mésophases mais ont perdu leur caractère initial de fluidité. Le principal exemple est le matériel fibrillaire rencontré au niveau des matrices extracellulaires ou la présence de liaisons covalentes intermoléculaires et le dépôt éventuel de cristaux minéraux abolit le caratère fluide présent dans les premières étapes de sécrétion du matériel hors des cellules.

La présence de géométries cristallines liquides a été déduite d'images obtenues en microscopie optique ou électronique, montrant des séries d'arceaux emboîtés superposés en strates parallèles. C'est le cas, par exemple, de la cuticule des crustacés ou de l'os compact des vertébrés (figure 7).

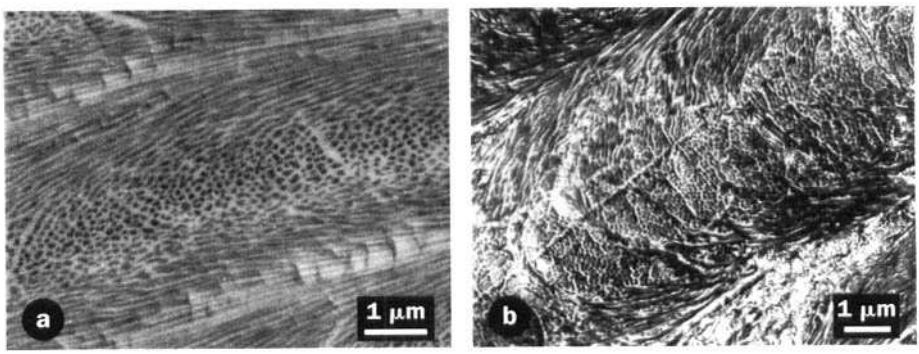


Figure 7 - Série d'arceaux au niveau de coupes ultrafines de tissus : squelettes, cuticule (a) et os (b)
Le matériel est décalcifié ; en microscopie électronique à transmission les deux tissus présentent des géométries similaires. Les fibrilles apparaissent successivement dans le plan de la coupe, ou obliques, ou transversales à ce plan.

Le modèle cholestérique permet d'établir le lien existant entre les macromolécules de structure adoptant une géométrie cristalline liquide et la visualisation en microscopie des coupes de ces matériaux après fixation et inclusion. D'autres macromolécules biologiques sont également concernées ; c'est le cas de l'ADN au niveau de certains chromosomes, de protéines au niveau d'inclusions cytoplasmiques, ou d'éléments du cytosquelette au niveau d'algues ou du plancton.

Ce modèle est une représentation idéale et des écarts à ce modèle s'observent dans les tissus biologiques sous forme de déviations, de défauts ou d'artéfacts. Des distorsions des strates cholestériques, vues en coupes transversales, donnent des figures très particulières, pour certains plans de coupe des doubles spirales d'arceaux apparaissent. Les défauts, de translation ou de rotation, rencontrés dans les cristaux liquides, sont visibles en coupe dans des matériaux biologiques aussi bien en microscopie optique en lumière polarisée qu'en microscopie électronique à transmission. Des artéfacts de microtomie, conséquence directe de la géométrie cholestérique ont été mis en évidence, induisant des variations régulières dans l'épaisseur des coupes. Il en résulte en microscopie des différences de contraste, parfois très accentuées, souvent interprétées de manière erronée comme des différences dans la nature chimique de l'échantillon.

4.3. VALIDATION À L'ÉCHELLE MOLÉCULAIRE

Les données morphologiques témoignant de la présence d'assemblages de type cristallin liquide en morphogenèse ont ouvert une démarche expérimentale ayant pour but de reproduire *in vitro* de tels auto-assemblages. Ces résultats expérimentaux sont réalisés à partir des macromolécules des MEC, extraites et purifiées.

L'étude du comportement en phases condensées des polymères des matrices extracellulaires a permis de mettre évidence des motifs organisés qui ont été analysés à

diverses échelles, en microscopie électronique à transmission mais surtout en microscopie optique en lumière polarisée. Les cristaux liquides sont en effet des fluides anisotropes, souvent très visqueux, présentant des propriétés de biréfringence avec des textures précises permettant de les caractériser (voir encadré *La microscopie optique en lumière polarisée*). Dans le cas des phases cholestériques, une extinction périodique est visible à chaque rotation de 180° des orientations moléculaires, produisant des figures typiques dites en « empreintes digitales ».

Des assemblages cristallins liquides ont été décrits à partir de solutions concentrées de polysaccharides, avec des dérivés de la cellulose et dans des suspensions de cristallites de cellulose et de chitine à des concentrations de 3 à 5%. Ces phases fluides peuvent être ensuite évaporées pour former des films qui conservent la géométrie cholestérique initiale : des figures en arceaux sont ainsi visibles sur des coupes ultrafines de ces films.

De même, des molécules en triple hélice de collagène, en solution dans l'acide acétique, s'assemblent spontanément, à des concentrations de 80 mg/ml ou plus, en domaines anisotropes présentant les textures typiques des phases cholestériques (figure 8a).

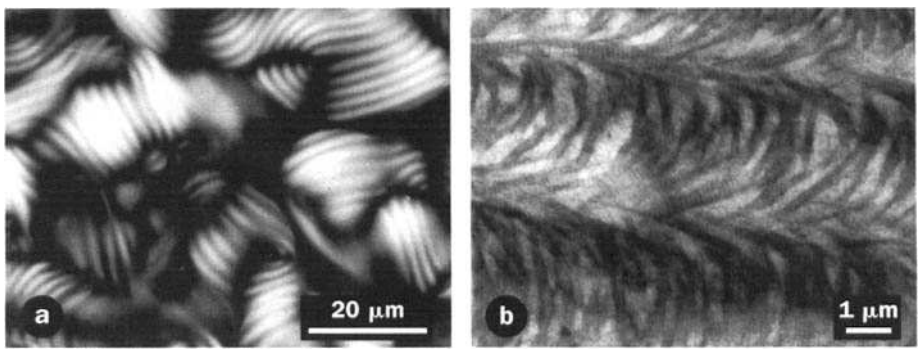


Figure 8
Assemblages cristallins liquides observés dans des solutions de collagène en lumière polarisée (a) et dans des gels fibrillaires en microscopie électronique à transmission (b)
Dans les textures en « empreintes digitales » la distance entre deux bandes noires successives correspond à une rotation de 180° des orientations moléculaires. Après gélification et formation des fibrilles cette rotation de 180° se retrouve au niveau de chaque série d'arceaux.

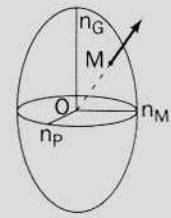
Les phases cholestériques visqueuses de collagène peuvent être secondairement stabilisées, en plaçant les solutions sous vapeurs d'ammoniaque. La modification de pH qui en résulte induit la formation d'un gel fibrillaire, pouvant être fixé et inclus pour la microscopie électronique (voir encadré *La microscopie électronique à transmission*). Les coupes ultrafines révèlent au niveau du réseau fibrillaire de collagène les figures en arceaux témoignant d'une géométrie cristalline liquide (figure 8b). De telles figures sont visibles dans de nombreux tissus biologiques et notamment dans l'os compact humain, au niveau de la trame dense de collagène

une fois retirée la phase minérale. Les réseaux ordonnés de fibrilles ainsi obtenus par auto-assemblages miment des structures proches de celles de tissus vivants.

La microscopie optique en lumière polarisée

La microscopie optique en lumière polarisée permet d'étudier les propriétés optiques liées à l'anisotropie d'un milieu. Les corps anisotropes sont biréfringents ; lorsqu'un rayon lumineux pénètre le milieu, il se divise en deux rayons d'égale intensité et polarisés à angle droit. Lorsqu'ils sont observés entre deux polaroïdes croisés à angle droit, ces corps laissent à nouveau passer la lumière selon les lois définies en optique cristalline (voir ci-dessous).

Dans un corps anisotrope, la lumière varie avec la direction de propagation, la surface d'onde est une ellipsoïde. L'ellipsoïde des indices possède trois axes principaux correspondant à la direction des trois indices principaux $\mathbf{n_G}$ (grand), $\mathbf{n_P}$ (petit) et $\mathbf{n_M}$ (moyen) (voir figure).



L'indice **n** est égal à $\mathbf{1/v}$, **v** étant la vitesse de la lumière.

Un microscope polarisant est un microscope optique ordinaire muni de deux prismes : *le polariseur*, situé entre la source lumineuse et la préparation et *l'analyseur*, situé entre l'objectif et l'oculaire. Lorsque les prismes sont croisés à angle droit, les rayons lumineux issus du polariseur sont totalement absorbés par l'analyseur, il y a extinction de la lumière. Si un corps anisotrope est placé entre le polariseur et l'analyseur la lumière est rétablie avec une intensité **I'** telle que :

$$\mathbf{I' = I \sin^2(2\alpha) \cdot \sin^2(\pi\delta/\gamma)}$$ [BERTRAND & ROUBAUD, 1969]

Dans cette relation :

I est l'intensité de la lumière à la sortie du polariseur et **I'** celle à la sortie de l'analyseur,

α est l'angle formé entre la direction du polariseur et le plus grand indice de l'ellipse des indices, définie comme la section de l'ellipsoïde des indices selon les axes principaux correspondant aux indices $\mathbf{n'_G}$ et $\mathbf{n'_P}$ et passant par le plan de la préparation (**n'** désigne les indices principaux correspondant à la lumière réfléchie),

δ est le retard de la composante de la vibration sur le polariseur par rapport à celle de l'analyseur. La valeur de ce retard dépend du corps anisotrope,

γ est la longueur d'onde.

L'intensité de biréfringence observée en un point d'un échantillon anisotrope est donc fonction du seul paramètre α. Cette intensité varie continûment. Elle passe par quatre maxima d'intensité observés correspondant à quatre angles de rotation de la platine du microscope alternant avec quatre minima où l'extinction est totale. L'emploi d'une lame auxiliaire comme une *lame teinte sensible* insérée entre l'analyseur et les oculaires, permet de lever l'indétermination (en fonction du changement de la teinte de polarisation) entre l'orientation de $\mathbf{n'_G}$ et de $\mathbf{n'_P}$ au maximum de biréfringence de l'échantillon.

Lorsque les solutions de collagène sont moins concentrées, autour de 40 mg/ml, l'ordre obtenu est alors moins régulier. Il s'agit d'un arrangement qualifié de précholestérique ; dans ce cas les molécules sont localement alignées et ondulent dans une même direction. En lumière polarisée, si cette direction est dans le plan de la préparation, on observe des extinctions de bandes fines ou larges selon la rotation des polaroïdes. Ces propriétés de biréfringence et les géométries associées sont celles observées dans un certain nombre de **tissus conjonctifs** comme les ligaments ou les tendons.

La microscopie électronique à transmission

Dans un microscope électronique à transmission (MET) le grandissement, pouvant atteindre 500 fois celui d'un microscope optique, permet de distinguer la structure fine des cellules et des tissus avec une résolution inférieure à 1 nm. La lumière incidente est un faisceau d'électrons, émis par un filament chauffé au sommet d'une colonne d'environ 2 mètres, placé sous un vide poussé. Les électrons, accélérés sous une tension moyenne de 100 000 volts, forment un faisceau convergent grâce à plusieurs bobines magnétiques. L'échantillon est introduit, dans la colonne, par l'intermédiaire d'un sas. L'image, formée sur un écran fluorescent ou sur une plaque photographique, résulte du contraste entre les domaines où les électrons traversent l'échantillon et ceux où ils sont absorbés au niveau de régions plus denses.

La fixation des tissus, la confection de coupes ultrafines et leur contraste sont un préalable à l'observation en microscopie électronique à transmission des échantillons biologiques qui sont au départ vivants et hydratés. Les fixateurs ont pour but de conserver la structure générale des tissus, le *glutaraldéhyde* établit des pontages covalents entre **protéines** et le *tétroxyde d'osmium* forme des complexes avec les doubles liaisons présentes essentiellement au niveau des bicouches lipidiques.

Le faible pouvoir de pénétration des électrons impose une épaisseur de 50 à 100 nm de l'objet à observer ; de telles coupes fines sont obtenues après la déshydratation puis l'inclusion de l'échantillon dans une résine époxy de type *Araldite* ; les coupes, à partir des blocs plastiques, sont réalisées avec un microtome, à l'aide d'un couteau de verre ou de diamant ; elles sont ensuite recueillies sur des grilles métalliques de 3 mm de diamètre qui sont introduites dans le porte-objet du microscope.

Le contraste observé au microscope électronique dépend du nombre atomique des éléments présents dans la coupe, plus ce nombre est élevé et plus le contraste est fort. Comme les tissus vivants sont principalement composés d'éléments de faible nombre atomique (carbone, oxygène, azote, hydrogène) des sels de métaux lourds sont utilisés pour imprégner sélectivement les constituants cellulaires. La fixation à l'osmium révèle les lipides au niveau des membranes cellulaires. Par ailleurs l'immersion des coupes, dans des solutions d'acétate d'uranyle ou de citrate de plomb, contraste certains composants des cellules ou de leur matrice environnante permettant de les identifier. On peut également révéler sur coupes des activités enzymatiques ou des macromolécules spécifiques d'un anticorps en induisant la précipitation locale d'un marqueur dense aux électrons. Des macromolécules isolées peuvent aussi être visualisées en MET après réalisation de répliques par ombrage métallique de la surface de l'échantillon.

5. *CONCLUSION ET PERSPECTIVES*

Les structures biologiques, en particulier dans les tissus squelettiques, constituent des modèles inspirant chercheurs et industriels dans la recherche de nouveaux matériaux. Cette démarche qui a débuté aux Etats-Unis depuis une vingtaine d'années s'appelle le biomimétisme.

En parallèle, les matériaux de substitution utilisés pour le remplacement de tissus endommagés doivent posséder des caractères biocompatibles et hémostatiques que l'on trouve en utilisant comme polymères de base la chitine ou le collagène (voir encadré *Les substituts tissulaires*). Dans ce contexte, des films, des éponges et des gels ont été proposés comme biomatériaux. La possibilité supplémentaire de mimer

in vitro les géométries rencontrées au niveau des réseaux extracellulaires présente l'avantage de se rapprocher des propriétés mécaniques des réseaux tissulaires. Ces dernières années, la production de gels de collagène orientés a été réalisée par polymérisation thermique sous écoulement laminaire, extrusion à travers des tubules de polyéthylène, ou alignement sous champ magnétique. Le passage par des assemblages de type cristallins liquides offre de nouvelles possibilités pour produire des géométries plus complexes sous forme de contreplaqués, très proches des systèmes rencontrés au niveau des MEC.

Les substituts tissulaires

Pour palier les déficiences du corps humain le développement de matériaux de substitution, de nature synthétique (métaux, céramiques, polymères) ou naturelle (chitosane, GAG, collagène), est en plein essor. Les propriétés physico-chimiques de ces biomatériaux sont déterminantes pour leur devenir dans l'organisme : rejet ou dégradation, adhésion et colonisation cellulaire, propriétés mécaniques. Les substituts à base de collagène sont intéressants par le faible pouvoir immunogène de cette protéine, associé à son rôle dans le comportement cellulaire et à la possibilité de reproduire *in vitro* les hiérarchies structurales du vivant. Après extraction et purification du collagène à partir de tissus conjonctifs (derme, tendon, os), le monomère acidosoluble aboutit, selon le protocole de préparation choisi, à différents types de matrices tridimensionnelles qui, associées aux cellules du tissu conjonctif, offrent des applications en ingénierie tissulaire. Dans les trois exemples cités ici les constituants mis en présence sont du collagène de type I et des fibroblastes.

- ✓ Les ***éponges de collagène***, obtenues par lyophillisation de solutions acido-solubles de cette protéine, sont des systèmes tridimensionnels poreux. La taille des pores, de 15 à 110 µm de diamètre, varie selon les critères de congélation précédant la lyophillisation. La structure en éponge permet aux fibroblastes ensemencés de proliférer en colonisant entièrement le substrat puis de sécréter du collagène fibrillaire. Les applications, en thérapie cellulaire ou génique, de ces systèmes sont liées à leurs propriétés de support biocompatible et biodégradable [CHEVALLAY & HERBAGE, 2000].
- ✓ Les ***gels de collagène hydratés*** sont obtenus par précipitation des monomères de collagène en fibrilles au sein d'une solution acido-soluble. Lorsque des fibroblastes sont associés à la solution de départ et à du milieu de culture, le gel fibrillaire faiblement concentré (moins d'1 mg/ml) et de structure aléatoire, emprisonne les cellules. Une contraction importante du gel s'observe alors dans les jours qui suivent et aboutit à ce que l'on appelle un *derme équivalent*. Ce tissu reconstitué devient une peau équivalente lorsqu'il est secondairement ensemencé par des cellules de l'épiderme, les kératinocytes, qui prolifèrent et recouvrent la sructure. Les essais de greffes réalisés chez de grands brûlés ont montré les qualités biologiques et mécaniques de ces substituts [COULOMB *et al.*, 1998].
- ✓ Les ***matrices de collagène ordonnées*** miment les hiérarchies structurales des tissus conjonctifs riches en collagène. La présence de fibrilles striées et leur agencement en réseaux ordonnés à grande distance sont reproduits *in vitro* à partir des solutions acidosolubles. Le collagène est soniqué et évaporé jusqu'à l'obtention de phases visqueuses cristallines liquides atteignant un ordre précholestérique puis cholestérique. Dans ces phases ordonnées, secondairement stabilisées à pH neutre, l'ordre suprafibrillaire est, en fonction de la concentration, proche de l'architecture du derme, du tendon ou de l'os compact. Des fibroblastes ensemencés à la surface des échantillons colonisent le réseau de collagène [BESSEAU *et al.*, 2001].

Il est à présent nécessaire, dans un contexte interdisciplinaire, d'étudier le comportement de cellules du tissu conjonctif dans des matrices ordonnées de biopolymères, de caractériser les propriétés mécaniques des réseaux fibrillaires, d'associer au réseau organique la présence d'un réseau minéral, d'obtenir un ordre à grande distance à des échelles supérieures au micromètre. Des perspectives d'applications dans le domaine des matériaux hybrides ou des biomatériaux découleront de ces travaux.

POUR EN SAVOIR PLUS

L. BERTRAND & M. ROUBAUD - *L'emploi du microscope polarisant*. J. LAMARRE ed., Paris (1969).

L. BESSEAU, B. COULOMB, C. LEBRETON-DECOSTER & M.M. GIRAUD-GUILLE - Production of ordered collagen matrices for three dimensional cell culture. *Biomaterials* **23**, 27-36 (2002).

Y. BOULIGAND - Liquid crystalline order in biological materials. *In : Liquid Crystalline Order in Polymers*. A. BLUMSTEIN ed. Academic Press, New York., 261-297 (1978).

B. CHEVALLAY & D. HERBAGE - Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures : application for tissue engineering and gene therapy. *Medical and biological engineering and computing* **38**, 211-218 (2000).

B. COULOMB, L. FRITEAU, J. BARUCH, J. GUILBAUD, B. CHRETIEN-MARQUET, J. GLICENSTEIN, E. LEBRETON-DECOSTER, E. BELL & L. DUBERTRET - Advantage of the presence of living dermal fibroblasts within reconstructed skin for grafting in humans. *Plastic and reconstructive surgery* **101**, 1891-1903 (1998).

P.G. DE GENNES - *The Physics of Liquid Crystals*. Oxford University Press, London, 330 p. (1974).

A. DOMARD - Applications of chitin in industrial and medical applications. *In : Chitin in Life Sciences*. M.M. GIRAUD-GUILLE ed. J. ANDRÉ publisher, Lyon, 98-109 (1996).

G. FRIEDEL - Les états mésomorphes de la matière. *Ann. Phys.* **19**, 273-474 (1922).

M.M. GIRAUD-GUILLE - Twisted liquid crystalline supramolecular arrangements in morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* **166**, 59-101 (1996).

M.M. GIRAUD-GUILLE - Plywoods in Nature. *Current Opinion in Solid State and Materials Science* **3**, 221-227 (1998).

D.E. INGBER, L. DIKE, L. HANSEN, S. KARP, A. MANIOTIS, H. MCNAMMEE, D. MOONEY, G. PLOPPER, J. SIMS & N. WANG - Cellular tensegrity : exploring how mechanical changes in the cytoskeleton regulate cell growth, migration and tissue pattern during morphogenesis. *Int. Rev. Cytol.* **150**, 173-224 (1994).

F. LIVOLANT - Ordered phases of DNA *in vivo* and *in vitro*. *Physica* **176**, 117-137 (1991).

A.C. NEVILLE - *Biology of fibrous composites : development beyond the cell membrane*. Cambridge University Press, 214 p. (1993).

T. MIYATA & T. TAIRA - Collagen engineering for biomaterial use. *Clinical Mater.* **9**, 139-148 (1992).

M. SARIKAYA - An introduction to biomimetics : A structural viewpoint. *Micr. Res. Techn.* **27**, 360-375 (1994).

Chapitre VII

CINÉTIQUE ENZYMATIQUE ET CONTRÔLE DES FLUX

Jean-Pierre MAZAT

Toute la biologie repose en définitive sur des échanges de matière et d'énergie et des transformations chimiques réalisées dans chaque cellule et entre les cellules. Nous nous intéresserons ici aux réactions chimiques, catalysées par des enzymes qui ont lieu à l'intérieur de chaque cellule et constituent le **métabolisme cellulaire**. Dans la première partie nous étudierons les lois les plus simples des réactions enzymatiques. Dans la deuxième partie nous verrons quelques propriétés que présente l'intégration des réactions enzymatiques d'une cellule pour constituer des **réseaux métaboliques**.

1. LA CINÉTIQUE ENZYMATIQUE

1.1. INTRODUCTION : POURQUOI DES ENZYMES ? [1]

1.1.1. Les enzymes accélèrent les réactions du métabolisme

La plupart des réactions du métabolisme sont soit impossibles, soit très lentes. Cette observation posa un sérieux problème aux biologistes de la fin du siècle dernier ainsi qu'à ceux du début de ce siècle. On fit de nouveau appel à la vieille idée de « **force vitale** » qui aurait pu mystérieusement diriger l'activité chimique des cellules. Mais la véritable réponse au problème de la vitesse des réactions chimiques dans la cellule réside dans l'existence de catalyseurs biologiques, les **enzymes**. Les enzymes augmentent les vitesses de réaction en diminuant l'énergie d'activation de ces réactions, c'est-à-dire l'énergie libre de formation d'un ou de plusieurs intermédiaires instables de la réaction, intermédiaires dont la probabilité d'existence est faible. Les enzymes agissent comme des catalyseurs, la fixation des substrats à leur surface permettant de stabiliser les états de transition (figure 1).

---

1. Pour des notions de base, on pourra consulter J.H. WEIL - *Biochimie générale*, 9e édition. Biochimie, Dunod (2001).

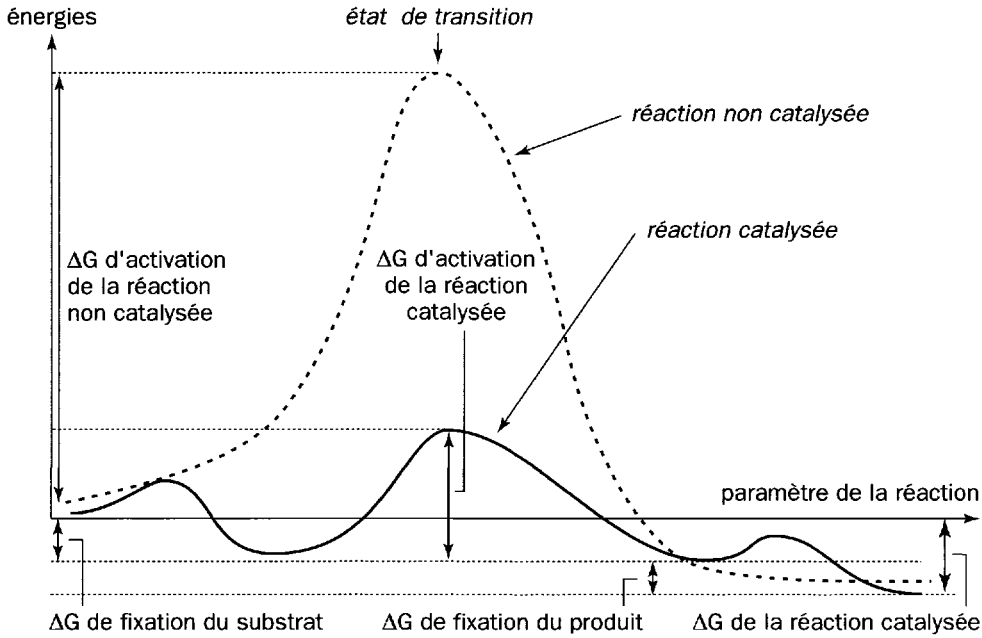


Figure 1 - Les enzymes diminuent l'énergie d'activation de la réaction.

1.1.2. Les enzymes permettent un couplage entre des réactions dont l'une est thermodynamiquement défavorable

Pour une série de réactions les énergies libres standard s'ajoutent algébriquement :

$$A \longleftrightarrow B \quad \Delta G_1 = -2\,kJ/mol$$

$$B \longleftrightarrow C \quad \Delta G_2 = +1\,kJ/mol$$

$$A \longleftrightarrow C \quad \Delta G = -1\,kJ/mol$$

La réaction $A \longrightarrow C$ est thermodynamiquement possible (une réaction peut avoir lieu spontanément de la gauche vers la droite si son ΔG est négatif). Les enzymes la rendent réellement possible en réalisant pratiquement le couplage des deux réactions à leur surface, c'est-à-dire en récupérant l'énergie fournie par la première réaction pour effectuer la seconde réaction (figure 2).

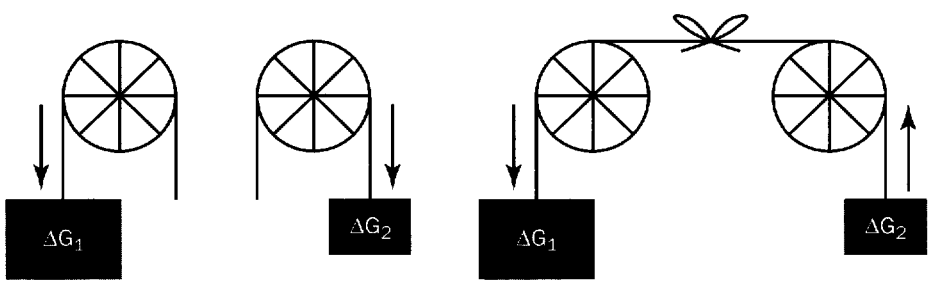


Figure 2 - Le « couplage » permet au petit poids de monter.

1.1.3. Les enzymes sont spécifiques

Spécificité de fixation

Il y a spécificité de fixation des substrats et produits, plus généralement de toutes les molécules pouvant se fixer sur l'enzyme (on les désignera globalement par le terme de **ligand**)[2]. Pour avoir une idée de cette spécificité, imaginons un cristal d'acide citrique et supposons qu'à la surface du cristal, on enlève une molécule d'acide citrique. Il restera un trou correspondant exactement à une molécule d'acide citrique (figure 3). On vient ainsi de fabriquer l'analogue d'un site de fixation de l'acide citrique à la surface d'une enzyme ; peu d'autres molécules de structure différente pourront venir se loger à cet emplacement. Cet exemple donne une image assez exacte de ce qu'est la **stéréospécificité** d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat (modèle de la clef et de la serrure).

L'inconvénient de ces analogies est de donner une image statique des interactions enzyme-ligands. Ces interactions sont régies par la loi d'action de masse, la constante d'équilibre étant désignée dans ce cas par le terme de **constante de fixation**, ou **constante de dissociation** selon le cas. D'autre part, les enzymes sont elles-mêmes des structures flexibles pouvant changer de **conformation**.

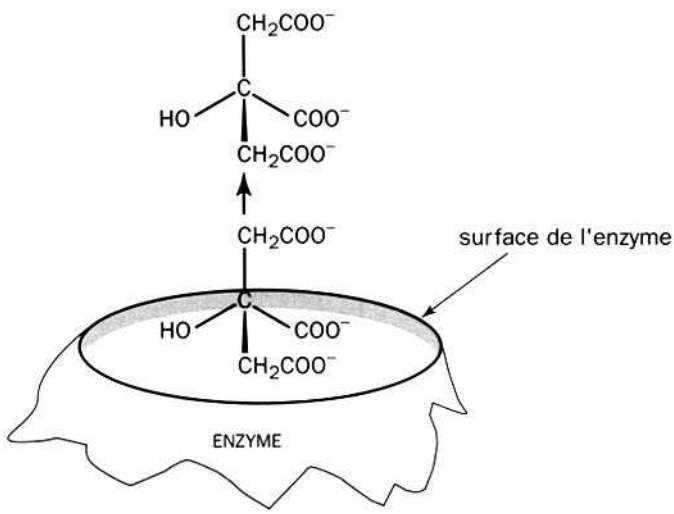


Figure 3 - Cristal d'acide citrique

La constante de fixation d'un ligand sur une enzyme pourra donc être variable et un même site enzymatique pourra fixer des molécules différentes : on aura alors une **fixation compétitive**. Par exemple, une même enzyme pourra assurer une même réaction (**transamination** dans notre exemple) avec différents substrats : l'aspartate, la tyrosine et la phénylalanine selon les schémas :

2. On notera la différence de taille (en général) entre un enzyme (poids moléculaire de 10 000 à plus de 100 000) et de ses substrats (poids moléculaire de 100 à 1000 le plus souvent).

aspartate + oxaloacétate ⟷ glutamate + α-cétoglutarate

tyrosine + oxaloacétate ⟷ glutamate + p-hydroxyphénylpyruvate

phénylalanine + oxaloacétate ⟷ glutamate + phénylpyruvate

Dans la cellule, il peut y avoir compétition entre différents substrats, ce qui peut donner lieu à une forme de régulation [3].

Spécificité de réaction

C'est la disposition particulière des différents groupes de l'enzyme au niveau du **site actif** qui assure la catalyse enzymatique, soit parce qu'ils participent directement à la réaction chimique, soit parce qu'ils contribuent à abaisser l'énergie d'activation de la réaction. Pour un métabolite, l'aspartate dans l'exemple ci-dessous, qui peut participer à plusieurs réactions du métabolisme, il faudra à chaque fois une enzyme différente pour effectuer les différentes réactions (figure 4).

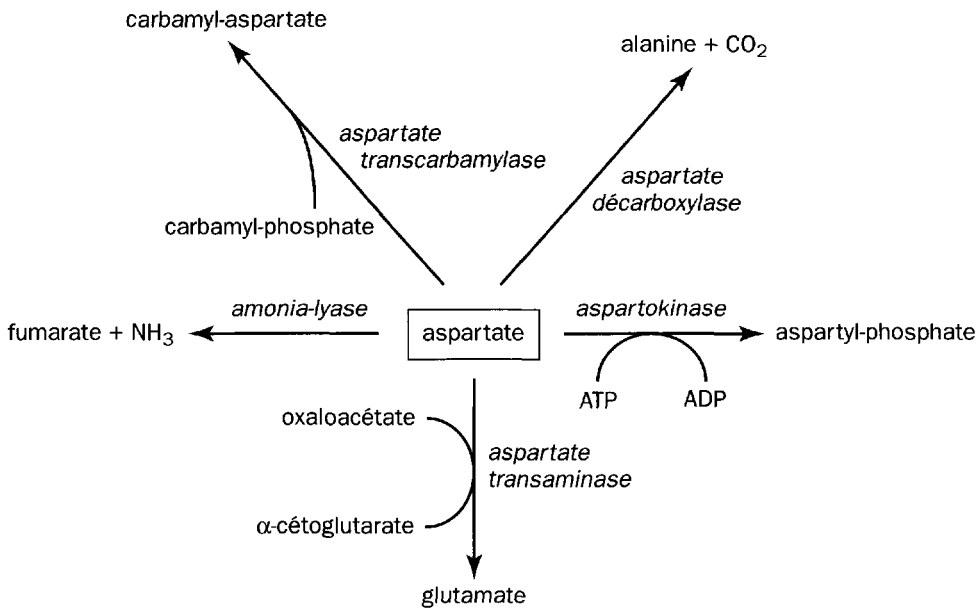


Figure 4 - Réactions différentes à partir du même substrat, l'aspartate
Chaque réaction est catalysée par une enzyme spécifique indiqué en italique.

Là encore, cette notion de **spécificité de réaction** n'est pas complètement stricte : il peut arriver qu'une enzyme catalyse des réactions différentes, soit parce qu'il comporte différents sites catalytiques (aspartokinase-homosérine déshydrogénase chez *E. coli* [4]) soit parce qu'au niveau du même site catalytique, différentes

3. Un substrat en plus de son rôle de substrat agira comme un inhibiteur compétitif des autres substrats pour le même enzyme. Le rôle substrat de chacun de ces métabolites dépendra donc non seulement de sa concentration mais des concentrations des autres métabolites substrats.

4. J.C. PATTE, P. TRUFFA-BACHI & G.N. COHEN - *Biochim. Biophys. Acta* **128**, 426-439 (1966).

réactions peuvent se produire en fonction du substrat fixé ou plus simplement des conditions thermodynamiques de la réaction (réaction dans un sens ou dans le sens opposé : hydrolyse ou synthèse selon la présence d'H_2O par exemple [5]).

1.1.4. Les enzymes sont régulées

Les enzymes sont nécessaires pour assurer le fonctionnement de la chimie cellulaire ; la complexité du métabolisme montre cependant qu'il ne faut pas que l'ensemble des voies métaboliques fonctionne de manière anarchique : l'activité des enzymes doit être régulée.

Il y a trois manières d'assurer cette régulation [6] : la cellule peut d'une part réguler la synthèse d'une enzyme au niveau du gène qui la code. L'activité des enzymes peut aussi être régulée directement par la fixation de molécules régulatrices à leur surface, au niveau du site actif par exemple, ou à d'autres sites en induisant un changement de conformation de la molécule enzymatique. Enfin l'activité d'une enzyme (et souvent son degré d'**oligomérisation**) peut être modulée par des transformations covalentes (phosphorylation par exemple).

1.2. L'ÉQUATION DE MICHAELIS-HENRI

1.2.1. Historique [7]

Dès le début, c'est-à-dire vers 1890 (figure 5), l'étude quantitative des réactions catalysées par des enzymes s'est faite en postulant que les systèmes vivants obéissaient aux lois de la physico-chimie : on éliminait ainsi tout recours au concept de « **force vitale** ». Il est apparu très rapidement que les réactions catalysées par des enzymes ne suivaient pas des cinétiques chimiques simples d'ordre 1 ou 0 comme on aurait pu le penser, mais quelque chose d'intermédiaire entre l'ordre 0 et 1, variable au cours de la réaction. On a alors assisté à une attitude classique dans l'histoire des sciences quand on s'écarte du consensus admis, consistant à « plier » les faits observés pour les faire rentrer dans le cadre de la science normale en ajoutant des termes *ad hoc* dans la cinétique. Cette attitude a prévalu de 1890 à 1902. C'est Victor HENRI en 1902, qui le premier a fait remarquer... une évidence :

---

5. Le sens d'une réaction dépend évidemment de la concentration des différents substrats et produits de la réaction : le sens d'une réaction d'oxydo-réduction dépend du rapport du deuxième couple oxydé-réduit, souvent dans la cellule NAD/NADH dont le rapport est très différent (facteur 100) dans la mitochondrie et le cytosol. La même réaction pourra donc avoir lieu dans un sens dans le cytosol et en sens inverse dans les mitochondries de la même cellule.
   Autre exemple : on peut par exemple faire de la synthèse peptidique en milieu anhydre (la synthèse peptidique produit une molécule d'eau). En milieu aqueux, c'est l'hydrolyse qui est favorisée.

6. J.H. WEIL - *Biochimie générale*, 9e édition. Biochimie, Dunod (2001).
   L. STRYER - *La Biochimie*, Médecine/Sciences, Flammarion (1992).

7. Voir par exemple, pour un historique, J.L. SEGAL - The developement of enzyme Kinetics. *In* : *The Enzymes*, Vol. 1. BOYER-LARDY- MYRBÄCH Eds, Academic Press, New York, 1-48 (1959).

les enzymes étant des catalyseurs, les réactions qu'ils catalysent vont suivre les lois de la catalyse chimique !! Il sera le premier à donner une formulation correcte de la cinétique enzymatique.

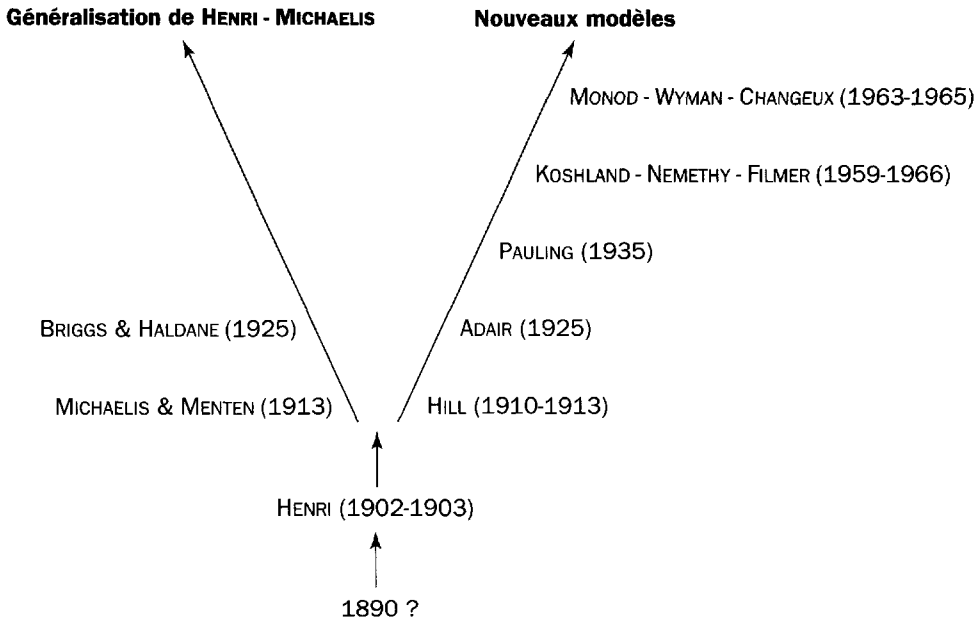


Figure 5 - Historique de la cinétique enzymatique

1.2.2. L'équation de MICHAELIS-MENTEN-HENRI

Le concept d'enzyme-substrat

Par analogie avec la catalyse chimique, V. HENRI proposa le schéma :

$$E + S \xrightarrow{K_S} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (1)$$

La vitesse de formation du produit [P] sera donc proportionnelle à la quantité du complexe enzyme-substrat [ES] et non à la quantité de substrat [S] restante (comme en cinétique chimique) :

$$v = d[P] / dt = k_2 . [ES]$$

v est exprimé théoriquement en $M . s^{-1}$. Pratiquement on utilise les $mM . s^{-1}$, $\mu M . s^{-1}$ ou $nM . s^{-1}$. Il reste maintenant à calculer [ES].

L'équilibre

Pour calculer [ES], V. HENRI fait tout simplement l'hypothèse que la première réaction

$$E + S \xrightarrow{K_S} ES$$

est à l'équilibre c'est-à-dire qu'elle obéit à la loi d'action de masse ; on a alors :

$$K_S = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{([E]_0 - [ES])[S]}{[ES]}$$

où $[E]_0$ est la concentration totale en enzyme : $[E]_0 = [E] + [ES]$.

On en déduit :
$$[ES] = \frac{[E]_0[S]}{K_S + [S]}$$

et donc :
$$v = \frac{k_2[E]_0[S]}{K_S + [S]} \qquad (2)$$

Approximation

En fait dans les conditions habituelles de mesure *in vitro*, où $[E]_0 << [S]$ (E est un catalyseur), la variation de [S] est faible au moins pendant les premiers temps de la réaction. On peut donc écrire :

$$v = v_0 = \frac{k_2[E]_0[S]_0}{K_S + [S]_0} = \frac{V_M[S]_0}{K_S + [S]_0} \qquad (3)$$

avec $V_M = k_2[E]_0$.

Ainsi, pendant un certain temps, la vitesse demeure constante et égale à v_0. Cela veut dire que dans cet intervalle de temps, l'apparition du produit doit être linéaire. La variable v_0 est appelée la vitesse initiale (figure 6).

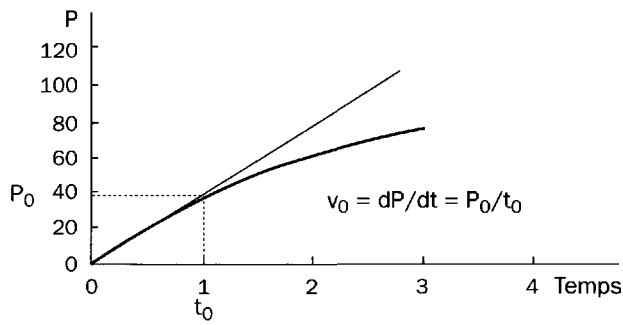


Figure 6 - Vitesse initiale

L'état stationnaire

En 1925, BRIGGS et HALDANE [BRIGGS & HALDANE, 1925] remarquent qu'il n'est pas sûr que le complexe ES soit en équilibre avec E et S et même qu'il risque fort de ne pas en être ainsi, si k_2 est grand. Ils montrent cependant [8] qu'après un temps

8. Ils montrent qu'après les premiers instants de la réaction où [ES] croît, [ES] va décroître d'une valeur qui n'excède pas $[E]_0$ jusqu'à 0, pendant que P va croître jusqu'à $[S]_0$ lorsque tout le substrat sera transformé en produit. Donc en moyenne $d[ES]/dt < [E]_0/[S]_0 \cdot d[P]/dt$. La variation de [ES] est donc très inférieure à la vitesse d'apparition de P que l'on observe car $[E]_0 << [S]_0$ (l'enzyme est un catalyseur présent en faible quantité).

court (vis-à-vis du temps pendant lequel on fait la mesure) on atteint un état quasi-stationnaire pendant lequel la formation de ES égale pratiquement sa disparition de telle sorte que la concentration de ES reste pratiquement constante. On a donc alors : d[ES]/dt = 0 (on parle d'état quasi-stationnaire, figure 7).

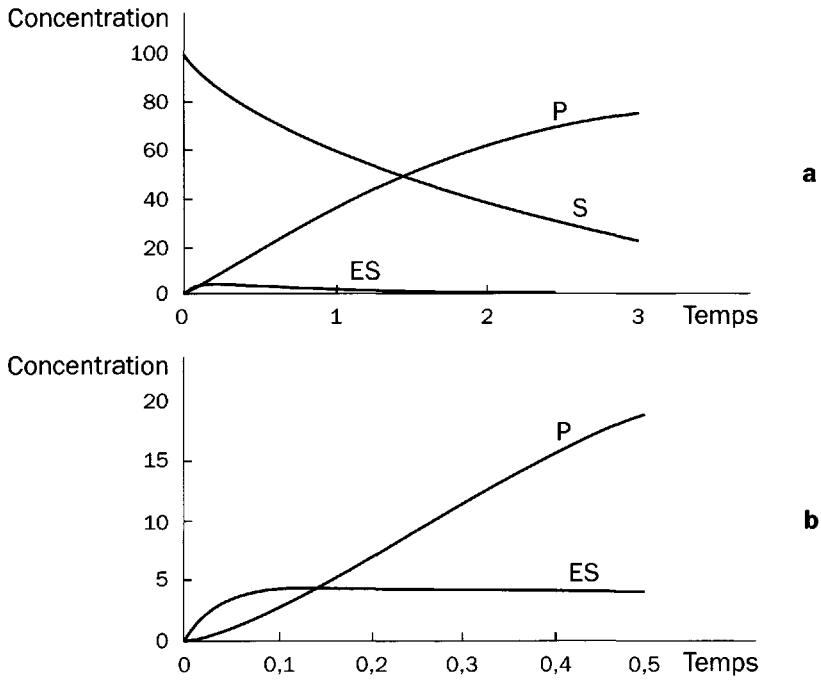


Figure 7 - L'état quasi-stationnaire (simulations)
La figure **b** représente les premiers instants de la figure **a** montrant le délai dans l'apparition du produit P, suivi d'une cinétique linéaire de production de P sur cet intervalle de temps qui correspond à une très faible variation de [ES].

Dans l'équation 1, il faut faire maintenant intervenir les constantes cinétiques de la première réaction :

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

On peut écrire : $d[ES]/dt = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] = 0$ (hypothèse de l'état quasi-stationnaire).

On a toujours $[E] = [E]_0 - [ES]$ (conservation de l'enzyme). En éliminant [E] entre ces deux équations, on obtient :

$$[ES]\left((k_{-1} + k_2) + k_1[S] \right) = k_1[E]_0[S]$$

et donc :

$$[ES] = \frac{k_1[E]_0[S]}{(k_{-1} + k_2) + k_1[S]} = \frac{[E]_0[S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]}$$

En conséquence, la vitesse v est déterminée par :

$$v = \frac{k_2 [E]_0 [S]}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{V_M [S]}{K_m + [S]} \quad (4)$$

avec $V_M = k_2[E]_0$ et $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$.

Pour les mêmes raisons que précédemment, on peut faire l'hypothèse: $[S] = [S]_0$ et écrire :

$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (5)$$

L'équation (5) bien que due à BRIGGS et HALDANE est en général appelée équation de MICHAELIS-MENTEN.

Remarques

1. *L'équation de HENRI apparaît donc comme le* ***cas particulier*** *où $k_{-1} >> k_2$, de telle sorte que K_m est la constante de dissociation du complexe K_S.*

2. *Le paramètre $K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$, appelé constante de MICHAELIS, est une caractéristique (cinétique) de la réaction et non plus une mesure de l'affinité du substrat pour l'enzyme (comme l'était $K_S = \frac{k_{-1}}{k_1}$).*

3. *C'est une* ***coïncidence*** *malheureuse que les deux hypothèses (équilibre et état stationnaire) conduisent à la même forme d'équation ; cela permet évidemment toutes les confusions. Il n'en sera pas de même pour des systèmes un peu plus complexes (réactions à deux substrats).*

4. *L'équation de MICHAELIS-HENRI apparaît toujours comme* ***cas particulier*** *dans les équations traduisant des mécanismes cinétiques plus complexes avec ou sans régulation. Elle traduit en effet la réaction après fixation sur une forme unique de l'enzyme et apparaîtra toujours lorsque l'on se trouvera, comme cas limite, en présence d'une seule forme d'enzyme.*

Propriétés d'une cinétique michaelienne

1. La représentation de l'équation de MICHAELIS-HENRI (éq. 5) est une hyperbole équilatère (figure 8) d'asymptote horizontale $v = V_M = k_2[E]_0$ qui correspond au cas où la totalité de l'enzyme est sous la forme enzyme-substrat : $[E]_0 = [ES]$.

   On vérifie que pour $[S]_0 = K_m$, on obtient $v = V_M/2$.

2. L'équation (5) et l'expression de V_M montrent que la vitesse est linéaire en fonction de la concentration en enzyme. C'est une propriété importante à vérifier expérimentalement de même que la linéarité de l'apparition de produit en fonction du temps.

L'équation de MICHAELIS-HENRI intégrée

On peut ne pas faire l'approximation $[S] = [S]_0$ et donc écrire :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{V_M [S]}{K_m + [S]} \tag{6}$$

Cette fois, S est variable et l'équation (6) est une équation différentielle à variables séparables que l'on peut mettre sous la forme :

$$\frac{K_m + [S]}{V_M [S]} d[S] = -dt \quad \text{ou} \quad \frac{K_m d[S]}{V_M [S]} + \frac{d[S]}{V_M} = -dt$$

soit, en intégrant :

$$\underset{\text{ordre 1}}{\frac{K_m}{V_M} \ln\left(\frac{[S]}{[S]_0}\right)} + \underset{\text{ordre 0}}{\frac{1}{V_M}\left([S] - [S]_0\right)} = -\left(t - t_0\right) \tag{7}$$

ln( ) désigne le logarithme népérien.

L'équation (7) montre clairement qu'une cinétique enzymatique est la composition d'une cinétique d'ordre zéro [dont la vitesse est indépendante de la concentration en substrat $d[S]/dt = -k$ et qui s'intègre en $([S] - [S]_0) = -k(t - t_0)$] et d'une cinétique d'ordre 1 [dont la vitesse est linéairement proportionnelle à la concentration en substrat $d[S]/dt = -k'[S]$ qui s'intègre en $\ln([S]/[S]_0) = -k'(t - t_0)$]. C'est ce qui avait été trouvé expérimentalement par les premiers expérimentateurs et avait rendu difficile l'établissement d'une loi générale pour la cinétique enzymatique par comparaison avec les lois de la cinétique chimique.

Les représentations d'une cinétique enzymatique michaelienne

Il est maintenant facile de déterminer (identifier) les paramètres K_m et V_M à partir de données expérimentales [9].

La figure 8 donne un exemple d'identification des paramètres V_M et K_m pour une série de points générés à partir des points calculés avec $K_m = 1$ et $V_M = 10$ en ajoutant et retranchant alternativement 0,2 aux valeurs calculées (voir aussi le tableau 1 en annexe).

Cependant, à une époque où il n'existait pas de calculateurs, on a cherché à linéariser les équations (3) et (5) afin de déterminer simplement les paramètres K_m et V_M . Ces représentations étant encore utilisées, nous les rappelons en annexe.

9. De nombreux programmes proposent une telle identification de paramètre, à commencer par l'outil solveur (*solver* en anglais) d'Excel© ; Kaleidagraph© est aussi largement utilisé pour cela.

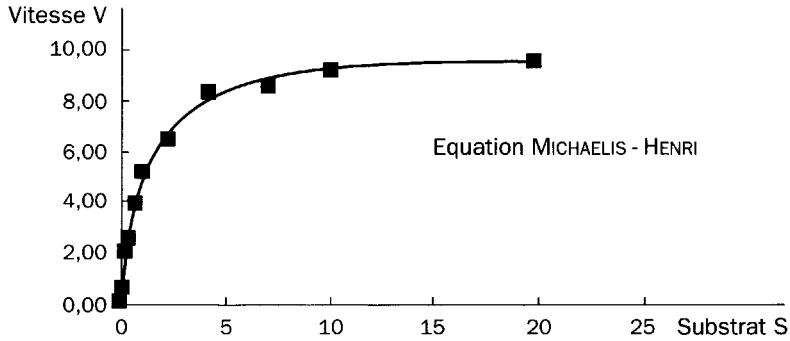


Figure 8 - Cinétique michaelienne
Points expérimentaux et hyperbole tracée avec K_m = 1,07 et V_M = 9,85

2. *LE CONTRÔLE DES FLUX MÉTABOLIQUES*

La question est maintenant de savoir comment les enzymes fonctionnent dans la cellule, c'est-à-dire lorsqu'ils font partie d'un réseau métabolique. Pour une première approche de ce problème on se limitera au ***cas d'une chaîne métabolique linéaire avec des métabolites intermédiaires uniques***.

2.1. LES COEFFICIENTS DE CONTRÔLE DES FLUX

2.1.1. Introduction et historique

Après avoir étudié indépendamment pendant de nombreuses années d'une part les propriétés cinétiques des enzymes et d'autre part les cartes du métabolisme [10], le rapprochement, sur un plan expérimental et théorique, de ces deux corpus de connaissances a été fait afin de répondre à la question : quel est le fonctionnement dynamique des réseaux métaboliques (flux, concentrations des métabolites intermédiaires) comportant plusieurs réactions successives et éventuellement avec une architecture complexe (branches, cycles, substrats communs...).

Un des pionniers dans ce domaine fut J. HIGGINS, qui dès 1965 proposa la notion de coefficient de réflexion, ancêtre des coefficients de contrôle ; ce travail se faisait en même temps que le développement balbutiant des premiers ordinateurs (analogiques) permettant de faire des simulations de chaînes métaboliques déjà complexes [HIGGINS, 1963 et 1965]. Puis se furent les deux articles fondateurs, l'un par KACSER et BURNS (1973) à Edinbourg, l'autre par HEINRICH et RAPOPORT

10. Les cartes du métabolisme décrivent l'ensemble des réactions enzymatiques qui ont lieu dans la cellule entre les différents métabolites. La référence dans ce domaine est la carte éditée par la société Boeringher sur le modèle des plans de villes quadrillés avec un petit livre associé pour localiser un enzyme donné (comme une rue).

(1974) à Berlin. Précisons que les approches des deux groupes sont complètement différentes. KACSER était un généticien étudiant des mutants **auxotrophes** pour la chaîne de biosynthèse de l'arginine c'est-à-dire des mutants incapables de synthétiser l'arginine, la plupart à cause de mutations nulles (enzyme inactive) dans les enzymes de la chaîne. Comme tout bon généticien, il a recherché des **révertants** de ses mutations nulles, c'est-à-dire des bactéries « mutantes du mutant nul » et capable de pousser de nouveau sans arginine et fut amené à mettre en évidence des révertants dont la nouvelle mutation conférait une activité très faible (quelques pour cent) à l'enzyme précédemment inactive.

Cela conduisit plus tard KACSER et BURNS à proposer une explication d'un problème posé depuis longtemps dans le cadre de la théorie de l'évolution [KACSER et BURNS, 1981]. Chez les eucaryotes comportant 2n chromosomes et donc deux exemplaires de chaque gène, l'inactivation d'un seul des gènes (hétérozygote) n'est en général pas gênante (voir chapitre II). Or, pour les gènes codant pour une enzyme intervenant dans une chaîne de biosynthèse, cela se traduit plus ou moins par une diminution de moitié de l'activité correspondante. Une autre manière de dire cela est de remarquer que, dans ces conditions, l'activité correspondant à la présence des deux gènes normaux est au moins le double de ce qui est nécessaire. Pourquoi dans ces conditions l'évolution n'a-t-elle pas sélectionné des cellules exprimant deux fois moins l'enzyme en question ? à quoi cela sert-il de produire deux fois plus d'enzyme qu'il n'est nécessaire ? KACSER et BURNS (1981) montreront que l'on ne peut pas échapper à cette situation et qu'elle est, pour la plupart des enzymes, une conséquence inéluctable de la théorie du contrôle du métabolisme.

L'approche de HEINRICH et RAPOPORT est plus théorique et propose des définitions analogues aboutissant aux mêmes relations, dont la relation de sommation (§ 2.1.5). David FELL (1996) fut par la suite le premier à appliquer l'algèbre linéaire pour le calcul explicite ou symbolique des coefficients de contrôle à partir des élasticités, définies comme les dérivées premières des fonctions de vitesse par rapport aux métabolites du réseau (voir le livre de D. FELL et § 2.2). Par la suite, C. REDER (1988) donnera une théorie générale du contrôle du métabolisme, applicable à tout réseau métabolique quelle que soit sa complexité en introduisant une représentation d'un réseau métabolique sous la forme d'une matrice (matrice de stœchiométrie). Elle montrera que les coefficients de contrôle sont des paramètres intrinsèques au réseau et peuvent être calculés à partir des élasticités des cinétiques enzymatiques. Elle démontrera également la validité des théorèmes de sommation pour un réseau métabolique quelconque.

Malgré des restrictions dans son application (pas de **canalisation** [11], pas de compartimentation [12], voisinage (linéaire) d'un état stationnaire...) la théorie du

11. La canalisation (channeling en anglais), indique des suites de réactions dans lesquelles l'organisation des enzymes impliquées est telle (association en une architecture adéquate) que le produit d'une réaction est directement repris comme substrat par l'enzyme catalysant la réaction suivante sans diffuser librement dans le cytosol.

contrôle du métabolisme fournit un cadre dans lequel on peut comprendre, simuler et prédire des aspects quantitatifs du métabolisme. Elle a permis de résoudre au moins deux problèmes de la biologie : la quantification de certains aspects de l'évolution du métabolisme (voir plus haut et KACSER & BURNS, 1981) et le problème du contrôle des **oxydations phosphorylantes** [GROEN *et al.*, 1982a], problème qui se posait depuis de nombreuses années et dont on donnera dans la suite quelques exemples.

On proposera dans cette partie une définition élémentaire des coefficients de contrôle de flux dans le cas le plus simple d'une chaîne métabolique linéaire. Cette définition se fera par rapport à la question :

Quelle est, dans une chaîne métabolique linéaire, l'influence d'une étape sur la valeur du flux global à l'état stationnaire ? La réponse à cette question conduit à la définition des coefficients de contrôle d'un flux. Un peu de théorie, là aussi élémentaire et dans un cas particulier, nous amènera à la relation fondamentale, la relation de sommation, dont nous préciserons les conséquences.

2.1.2. Etat stationnaire

La chaîne linéaire que nous allons considérer est représentée dans la figure 9.

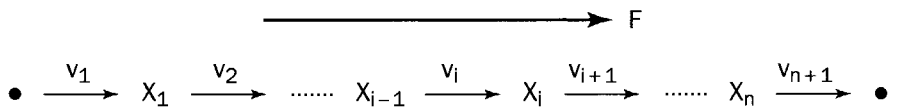


Figure 9 - Chaîne métabolique linéaire

$X_1 \ldots X_{n-1}$ sont les métabolites, $x_1 \ldots x_{n-1}$, sont leurs concentrations et $v_1 \ldots v_n$ sont les vitesses des étapes 1 ... n. Les gros points symbolisent les entrées et les sorties du système qui sont supposées constantes.

L'évolution de cette chaîne métabolique est simplement décrite par les n – 1 équations :

$$\begin{cases} \dfrac{dx_1}{dt} = v_1 - v_2 \\ \dfrac{dx_2}{dt} = v_2 - v_3 \\ \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots\ldots \\ \dfrac{dx_{n-1}}{dt} = v_{n-1} - v_n \end{cases} \qquad (8)$$

12. Certaines réactions du métabolisme sont situées dans des compartiments fermés. Par exemple toutes les réactions du cycle de KREBS sont localisées dans les mitochondries et donc ne peuvent pas être en contact avec le reste du métabolisme cytosolique. Les métabolites qui interviennent dans des réactions situés dans le cytosol et dans les mitochondries peuvent être considérés comme des espèces différentes.

A l'état stationnaire :

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{dx_2}{dt} = ... = \frac{dx_{n-1}}{dt} = 0 \qquad (9)$$

et donc : $v_1 = v_2 = \ldots = v_{n-1} = F.$

L'ensemble des équations (9) permettent de définir les concentrations des métabolites dans les états stationnaires, s'ils existent. On appellera : $x^0_1, x^0_2, \ldots, x^0_n$ les concentrations pour l'un de ces états stationnaires supposé stable (i.e. observable).

2.1.3. Définitions

Pour répondre à la question : *Quelle est, dans une chaîne linéaire, l'influence de l'étape i sur la valeur du flux global à l'état stationnaire ?*, il suffit, au moins par l'esprit, sinon réellement, de faire subir à l'étape i une petite variation δv_i de sa vitesse v_i et de mesurer la variation δF du flux F à l'état stationnaire.

Définition 1

On pourra définir le coefficient de contrôle C'_i de l'étape i sur le flux F par :

$$C'_i = \frac{\delta F}{\delta v_i} \qquad (10)$$

C'est une définition tout à fait naturelle. En effet :

- ✓ Si l'étape i n'exerce aucun contrôle sur le flux, alors $\delta F = 0$ et le coefficient de contrôle C'_i est égal à zéro.
- ✓ Si l'étape i exerce un contrôle complet sur le flux F, alors $\delta F = \delta v_i$ et le coefficient de contrôle C'_i est égal à 1.

Cependant ce n'est pas une définition mathématiquement correcte, ou plutôt, on ne pourra pas l'utiliser mathématiquement. Cela vient du fait que la manière dont on faisait varier v_i n'est pas définie.

La vitesse v_i est une fonction des concentrations $x_1 \ldots x_n$ et d'un certain nombre de paramètres que l'on symbolisera par λ_i qui sont des paramètres externes [13] (les concentrations $x_1 \ldots x_n$ sont des paramètres internes au réseau métabolique) et qui permettront de faire varier la vitesse v_i. Dans la suite, on supposera que λ_i est un paramètre externe spécifique de l'étape i, c'est-à-dire que les autres vitesses v_i, avec $i \neq j$ ne dépendent pas de λ_i, autrement dit : $v_i = v_i(x_1, x_2, \ldots, x_{n-1}, \lambda_i)$.

Les concentrations et donc aussi le flux à l'état stationnaire deviennent alors des fonctions des λ_i :

$$x^0_i = x^0_i(\lambda_1, \lambda_2, \ldots, \lambda_n)$$

et donc : $F = v_i(x^0_1, x^0_2, \ldots, x^0_{n-1}, \lambda_i) = F(\lambda_1, \lambda_2, \ldots, \lambda_n).$

13. λ_i pourra représenter un inhibiteur, un activateur, la concentration en enzyme, la température, le pH, des régulateurs n'appartenant pas au réseau...

Définition 2

On peut alors donner la définition mathématique suivante des coefficients de contrôle :

$$C'_i = \frac{\partial F}{\partial \lambda_i} \Big/ \frac{\partial v_i}{\partial \lambda_i} \qquad (11)$$

A partir de cette définition, ou de la définition précédente, on voit que le coefficient de contrôle relie la variation de la vitesse à la variation du flux :

$$\frac{\partial F}{\partial \lambda_i} = C'_i \frac{\partial v_i}{\partial \lambda_i} \qquad (12)$$

On montre (voir REDER, 1988) que la définition du coefficient de contrôle est intrinsèque, c'est-à-dire que sa valeur ne dépend pas de la manière dont on le détermine. Autrement dit, si l'on emploie deux paramètres λ_i et μ_i spécifiques de l'étape i, on obtiendra la même valeur du coefficient de contrôle.

Remarque *- Nous utilisons ici la définition des coefficients de contrôle donnée par HEINRICH et RAPOPORT (1974) et par REDER (1988). La définition donnée par KACSER et BURNS fait intervenir les logarithmes :*

$$C_i = \frac{\partial \ln F}{\partial \ln \lambda_i} \Big/ \frac{\partial \ln v_i}{\partial \ln \lambda_i} \qquad (13)$$

C'est la raison pour laquelle nous notons C'_i les coefficients de contrôle définis plus haut pour distinguer les deux définitions. ***Dans le cas d'une chaîne linéaire les deux définitions sont équivalentes****, c'est-à-dire que les 2 coefficients de contrôle C_i et C'_i ont la même valeur.*

2.1.4. Détermination des coefficients de contrôle

Méthode

Il y a plusieurs manières de déterminer les coefficients de contrôle des flux. L'une est très simple. Elle consiste à appliquer la définition même qui conduit aux définitions (10) ou (11). Pour cela, il faut disposer d'un moyen spécifique de modifier l'activité d'une étape à l'intérieur d'une chaîne métabolique.

Les inhibiteurs spécifiques quand ils existent sont de bons outils. Ils ont été largement employés pour étudier le contrôle des oxydations phosphorylantes mitochondriales. Le principe de la méthode est représenté dans la figure 10. On étudie l'effet de l'inhibiteur d'une part sur l'étape isolée prise dans les mêmes conditions que dans le réseau métabolique (en particulier aux mêmes concentrations de substrat et de produit). La pente à l'origine (pour I = 0) fournit le dénominateur de l'équation (11) : $\partial v_i/\partial \lambda_i$, le paramètre λ_i étant ici la concentration en inhibiteur I. Puis on étudie d'autre part l'effet du même inhibiteur sur l'étape choisie, mais cette fois dans le réseau métabolique lui-même et on mesure son effet sur le flux étudié. La pente à l'origine fournit cette fois le numérateur de l'équation (11) : $\partial F/\partial \lambda_i$. Le rapport des deux pentes à l'origine fournit donc le coefficient de contrôle choisi.

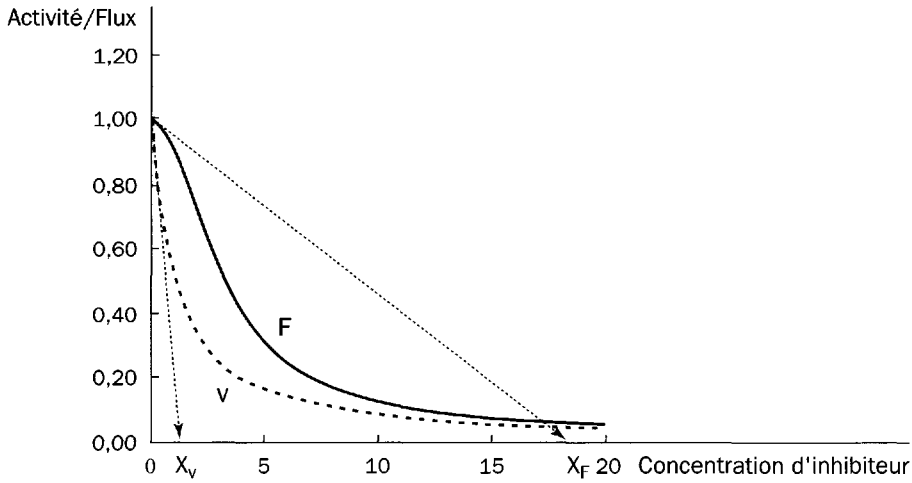


Figure 10 - Détermination d'un coefficient de contrôle par la méthode des inhibiteurs

$$C_I^F = \frac{\text{pente}(F)}{\text{pente}(v)} = \frac{X_V}{X_F}$$

Comme beaucoup de nos exemples se rapportent à la détermination des coefficients de contrôle des oxydations phosphorylantes mitochondriales, nous en donnons un schéma dans la figure 11. Le sens du flux est du **NADH** ou du succinate vers l'oxygène selon le substrat respiratoire fourni aux mitochondries [14].

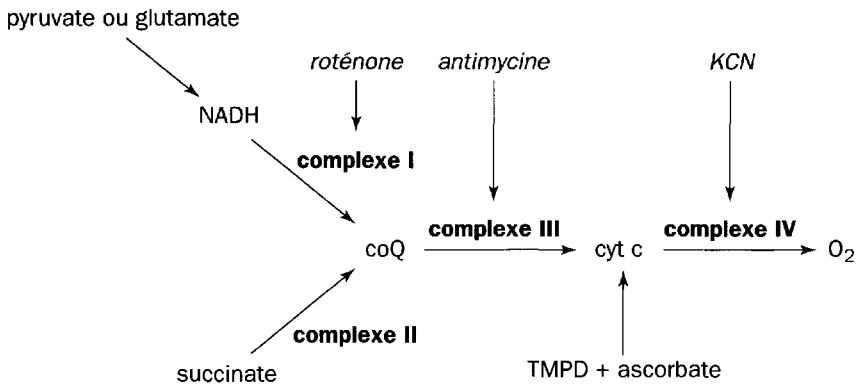


Figure 11 - Chaîne respiratoire mitochondriale
Le TMPD (tétraméthyl p-phénylènediamine) est un donneur d'électrons pour le cytochrome c. Les inhibiteurs spécifiques des différents complexes sont indiqués en italique.

On se reportera au chapitre I, figure 8 pour une présentation plus détaillée de la bioénergétique mitochondriale.

14. Le succinate ($HOOC–CH_2–CH_2–COOH$) est un métabolite du cycle de KREBS qui intervient aussi comme substrat (réduit) du complexe II de la chaîne respiratoire.

Exemple 1

La figure 12 montre comment cette méthode a été appliquée à la détermination du coefficient de contrôle de la cytochrome oxydase sur le flux de la respiration dans les mitochondries de muscle. L'inhibiteur spécifique de la cytochrome oxydase est dans ce cas le cyanure de potassium (KCN). Les carrés pleins montrent l'action du KCN sur le flux global de consommation d'oxygène en utilisant une voie qui entre par le NADH. La pente à l'origine coupe l'axe des x vers 80 µM en KCN (ce qui correspond à une pente de 1,25 μM^{-1}).

Maintenant il faut étudier les effets du KCN sur la cytochrome oxydase elle-même. Dans ce cas particulièrement favorable, on peut « isoler » artificiellement la **cytochrome c oxydase**, du reste de la chaîne respiratoire elle-même, par l'antimycine (figure 12). Les carrés vides montrent l'inhibition de cette activité isolée par les mêmes concentrations de KCN. L'intersection de la tangente à l'origine avec l'axe des x est obtenue à 13 µM en KCN (ce qui correspond à une pente de 7,7 μM^{-1}). Le coefficient de contrôle ainsi mesuré est donc C = 13/80 = 1,25/7,7 = 0,16. Cela signifie pratiquement qu'au voisinage du point stationnaire, la variation du flux sera 0,16 fois celle de la vitesse de la cytochrome c oxydase : $\Delta F = 0{,}16 \cdot \Delta v_{cox}$.

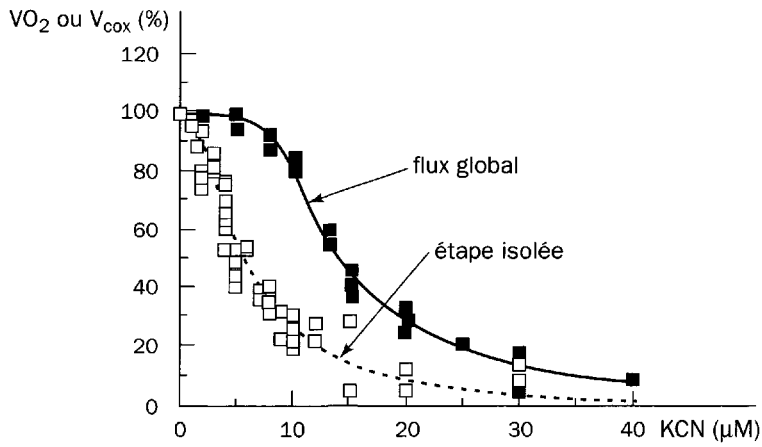


Figure 12 - Contrôle de la respiration de mitochondries isolées de muscle de rat par la cytochrome oxydase (d'après LETELLIER *et al.*, 1994)
Courbes d'inhibition du flux respiratoire (■) et de la cytochrome oxydase (□) par le cyanure. La détermination des pentes à l'origine se fait par une régression linéaire sur les premiers points.

Exemple 2

On n'est pas obligé de mesurer l'effet de l'inhibiteur sur l'étape isolée lorsque l'on connaît le mode d'action de l'inhibiteur. C'est le cas pour l'**échangeur** des nucléotides adényliques (voir chapitre I), une autre enzyme de la membrane interne mitochondriale intervenant dans la chaîne des oxydations phosphorylantes, (figure 13) : cette enzyme échange un **ATP** contre un **ADP** au niveau de la **membrane** interne mitochondriale.

Un inhibiteur spécifique de cette activité est le carboxyatractylate. Son affinité pour l'échangeur est telle que la courbe d'inhibition peut être considérée comme une droite reliant le point d'activité maximale F_0 à concentration nulle de carboxyatractylate sur l'axe des ordonnées au point de concentration en carboxyatractylate I_{max} donnant juste une inhibition totale de l'activité.

La pente de cette droite est évidemment : $-(F_0/I_{max})$. Dans ce cas, le coefficient de contrôle est alors donné par la formule :

$$C' = \frac{\partial F}{\partial I} \Big/ \left(-\frac{F_0}{I_{max}} \right) = -\frac{\partial F}{\partial I} \frac{I_{max}}{F_0}$$

($\partial F/\partial I$ est négatif de telle sorte qu'en général C'_i est positif).

Dans l'exemple de la figure 13 on détermine un coefficient de contrôle de 0,1.

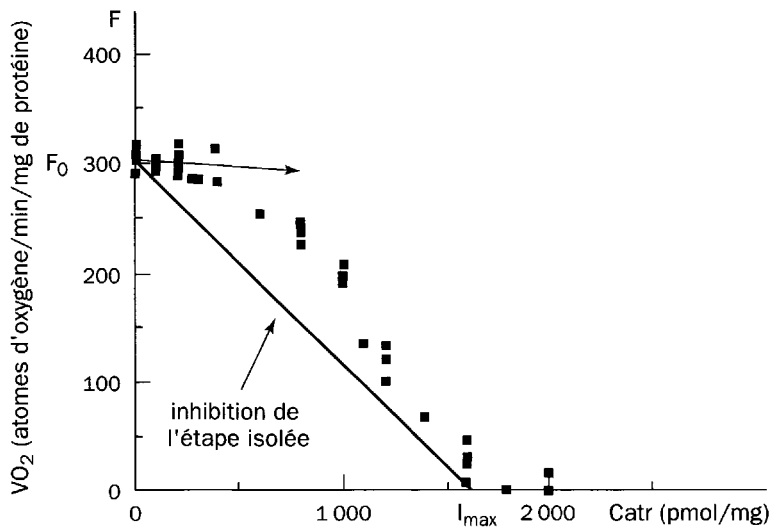


Figure 13 - Inhibition de la respiration mitochondriale par le carboxyatractylate
Le carboxyatractylate est un inhibiteur spécifique de l'échangeur ATP/ADP avec une très forte affinité pour cette **protéine**. Le coefficient de contrôle de l'échangeur ATP/ADP est déterminé par le rapport des deux pentes (d'après LETELLIER *et al.*, 1993). La détermination des pentes à l'origine se fait par une régression linéaire sur les premiers points.

Exemple 3

Enfin une manière très simple de mesurer un coefficient de contrôle est simplement d'ajouter des enzymes de façon incrémentale (figure 14). L'augmentation de la vitesse de l'étape isolée est alors en général proportionnelle à la quantité d'enzyme ajoutée (il faut le vérifier expérimentalement). On a donc le δv_i et on mesure le δF. On en déduit le coefficient de contrôle : $C'_i = \partial F/\partial v_i$.

C'est ainsi que GROEN *et al.* (1982a) ont étudié le contrôle exercé par l'hexokinase sur le flux de consommation d'oxygène par les mitochondries. De même, TORRES *et al.* (1986) ont employé cette méthode pour mesurer les coefficients de contrôle d'un certain nombre d'enzymes de la glycolyse.

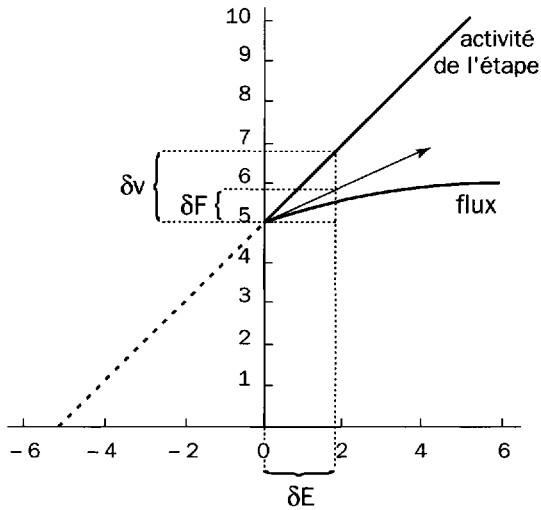


Figure 14 - Détermination d'un coefficient de contrôle par incrément d'enzyme

Limitation à l'usage des inhibiteurs

✓ L'utilisation des inhibiteurs pour la détermination des coefficients de contrôle, comme nous l'avons fait ci-dessus, suppose qu'ils sont **réellement spécifiques** de l'étape étudiée. On peut cependant utiliser un jeu de plusieurs inhibiteurs agissant différemment (de manière indépendante) sur plusieurs étapes simultanément ; mais l'analyse est plus compliquée (le lecteur intéressé pourra se rapporter à l'analyse d'un tel cas par RIGOULET *et al.*, 1988).

✓ Si l'inhibiteur doit traverser une membrane, il faut tenir compte de sa répartition de part et d'autre, ou tout au moins s'assurer qu'elle est la même lorsque l'on étudie l'effet sur la chaîne métabolique dans son ensemble ou sur l'étape isolée.

✓ Avec des inhibiteurs au mode d'action connue (compétitif, non compétitif...) il faut connaître les constantes d'inhibition et être sûr que ce sont les mêmes sur l'étape isolée et sur l'étape dans le système.

✓ Il est parfois difficile de mesurer les pentes à l'origine. Dans certains cas (figure 13) il n'est pas évident de savoir si l'on a affaire à une pente faible ou bien si l'on part d'une pente nulle qui s'infléchit rapidement. Autrement dit, le coefficient de contrôle de cette étape est-il 0,1, comme nous l'avons annoncé, ou bien est-il nul ? Dans ce cas, on pourra utiliser la détermination des coefficients de contrôle à partir des élasticités (voir plus loin).

2.1.5. Relation de sommation

On peut définir un coefficient de contrôle pour chacune des étapes de la chaîne métabolique linéaire : on montre que l'on peut alors écrire la relation [15] :

$$C'_1 + C'_2 + \ldots + C'_n = 1 \quad \text{ou} \quad \sum_i C'_i = 1 \tag{14}$$

Conséquences de la relation de sommation

La relation de sommation a trois conséquences importantes :

1. Le contrôle d'un flux *peut être partagé entre plusieurs étapes*. Ce résultat va contre l'idée de l'existence d'une **étape limitante** unique, étape qui donnerait sa vitesse au flux. Plusieurs étapes peuvent concourir à l'établissement d'un état stationnaire. Cela a été bien illustré par GROEN *et al.* (1982a) pour les oxydations phosphorylantes mitochondriales.
2. Il y a une autre conséquence qui résulte de la relation de sommation lorsque l'on a affaire à une chaîne linéaire. Compte tenu de leur définition, les coefficients de contrôle sont souvent compris entre 0 et 1 (en absence de régulation et pour des chaînes métaboliques linéaires). Supposons que la chaîne comprenne un nombre d'étapes suffisantes (disons au moins 5). Si le contrôle du flux était également réparti, chaque étape aurait un coefficient de contrôle de 0,2. Mais en général il n'en est pas ainsi et une ou plusieurs étapes ont des coefficients de contrôle plus élevés. Par suite, comme la somme des coefficients de contrôle doit être égale à 1, les autres ont alors un coefficient de contrôle faible. Bien que le raisonnement ci-dessus n'ait aucune rigueur mathématique, ce résultat est assez couramment observé comme cela a été montré par KACSER et BURNS (1973) : ils soulignent que *dans un système comprenant un nombre raisonnable d'enzymes, presque toutes les enzymes apparaîtront comme « étant en excès »*. Cela veut dire que, si l'on choisit une telle enzyme, on peut réduire son activité (parfois considérablement) sans effets appréciables sur le flux.
3. Une autre conséquence de la relation de sommation est que *lorsque l'on change d'état stationnaire on peut aussi changer la distribution des coefficients de contrôle*. Cela a été également mis en évidence par GROEN *et al.* (1982a) dans leur étude du contrôle des oxydations phosphorylantes mitochondriales.

Application

Un des plus grands succès de la théorie du contrôle du métabolisme a été d'apporter une explication simple à un ensemble de résultats en apparence contradictoires concernant les oxydations phosphorylantes mitochondriales [GROEN *et al.*, 1982a et MAZAT *et al.*, 2001]. Depuis longtemps différents auteurs s'affrontaient sur le problème de savoir quelle étape – supposée unique – contrôlait la respiration

15. Une démonstration de cette égalité est donnée dans KACSER et BURNS (1979) et, sous une forme plus générale, par C. REDER (1988).

mitochondriale et donc la synthèse d'ATP. Selon les conditions, l'étape catalysée par le transporteur des nucléotides adényliques ou par la cytochrome c oxydase ou encore par l'**ATP synthétase** apparaissait comme limitante. L'étude quantitative et systématique de GROEN *et al.* (1982a) a permis de montrer, en calculant les coefficients de contrôle d'un certain nombre d'étapes impliquées dans les oxydations phosphorylantes, que le contrôle était partagé par plusieurs de ces étapes et que de plus, toujours en accord avec la théorie, la distribution du contrôle variait avec l'état stationnaire étudiée (ici la vitesse de respiration). En absence de synthèse d'ATP (appelé état 4), la respiration est faible car uniquement due à la perméabilité passive de la membrane aux protons qui exerce tout le contrôle. Par contre, dans les états de fonctionnement intermédiaire et même au maximum de l'activité respiratoire, le contrôle est distribué parmi différentes étapes parmi lesquelles, l'échangeur des **nucléotides** adényliques, la cytochrome c oxydase et le transporteur des acides dicarboxyliques.

2.1.6. Conclusion

La définition des coefficients de contrôle permet de quantifier l'effet de la variation d'une étape sur le flux à l'état stationnaire d'une chaîne métabolique. On voit donc tout l'intérêt de ce concept non seulement pour comprendre le fonctionnement normal d'une chaîne métabolique mais aussi dans deux situations extrêmes :

✓ en médecine, dans le cas de déficits d'étapes du métabolisme,

✓ en biothechnologies lorsqu'on amplifie le gène codant pour l'enzyme d'une étape.

Dans chacun de ces cas la connaissance du coefficient de contrôle de l'étape sur le flux n'est pas sans intérêt (à quoi servirait l'amplification d'une étape dont le coefficient de contrôle est nul ?).

La relation de sommation permet de prévoir que plusieurs étapes peuvent concourir à contrôler un flux (on préfèrera le terme « contrôler » à celui de « limiter » dont la connotation comme « étape limitante » est trop forte). En général, on peut donc dire qu'***il n'y a pas une étape limitante unique*** et cela est de plus en plus vérifié expérimentalement. Ce dernier point est sans doute l'un des apports les plus importants de la théorie du contrôle du métabolisme.

2.2. COEFFICIENTS D'ÉLASTICITÉ [16]

2.2.1. Introduction

On comprend intuitivement que la valeur des coefficients de contrôle (de flux ou de concentrations) va dépendre de deux facteurs :

✓ l'architecture du réseau lui-même : chaîne linéaire, chaîne branchée, cycles...

✓ la dépendance des vitesses en fonction des variations des pools de métabolites.

16. Rappelons que nous traiterons ici le cas d'une chaîne métabolique linéaire avec des métabolites intermédiaires uniques.

Dans un réseau métabolique les pools de métabolites sont en effet les liens entre les différentes étapes. Lorsque l'on effectue une perturbation dans la vitesse d'une étape, cette perturbation entraîne un changement dans un certain nombre de concentrations de métabolites intermédiaires. Ces changements de concentrations vont à leur tour entraîner une modification des vitesses qui en dépendent, qui entraînent à leur tour une modification d'autres métabolites qui... On a donc affaire à une réponse globale du réseau métabolique qu'il n'est pas nécessairement facile de prévoir intuitivement (figure 15).

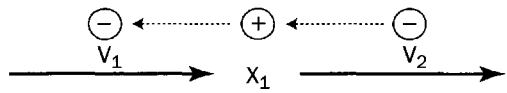


Figure 15 - Réponse d'un réseau métabolique à la perturbation de l'une de ses étapes

Sur la figure 15, on peut avoir la séquence d'évènements suivants : une inhibition de v_2 entraîne une augmentation de X_1 qui entraîne une inhibition de v_1... Ces liens sont concrétisés par la manière dont les vitesses dépendent des concentrations de ces métabolites. Il faudrait théoriquement connaître toutes les fonctions de vitesses du réseau métabolique. En fait, si l'on ne s'intéresse qu'aux faibles variations au voisinage d'un état stationnaire, il suffit de connaître la dépendance des vitesses en fonction des concentrations des métabolites au voisinage de cet état stationnaire : ce sont les **élasticités**.

2.2.2. Définition : coefficient d'élasticité

Il est défini par : $$\varepsilon'_i{}^j = \frac{\partial v_j}{\partial x_i} \qquad (15)$$

ou, si l'on travaille avec les valeurs normalisées (logarithmiques) :

$$\varepsilon_i{}^j = \frac{\partial \ln v_j}{\partial \ln x_i} \qquad (16)$$

On passe facilement d'une définition à l'autre par : $\varepsilon_i{}^j = \varepsilon'_i{}^j \frac{x_i}{v_j}$ (17)

Remarques

1. *Il faut bien comprendre qu'un coefficient d'élasticité n'a rien à voir avec le réseau métabolique. C'est une propriété locale de l'enzyme isolée elle-même, comme nous allons le voir ci-dessous.*
2. *Le coefficient d'élasticité est égal à la pente de la tangente à la courbe $v = f(x_i)$ ou $\ln v = g(\ln x_i)$.*

2.2.3. Détermination des coefficients d'élasticité dans quelques cas simples

Equation de MICHAELIS (figure 16)

A la simple observation de la figure 16, on comprend que l'élasticité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat sera quasi-nulle à saturation du substrat ([S] >> K_m), car une variation de S, dans ces conditions n'entraîne que peu de changement dans la vitesse, mais sera différente de 0 pour les autres valeurs de S et d'autant plus élevée que S sera faible.

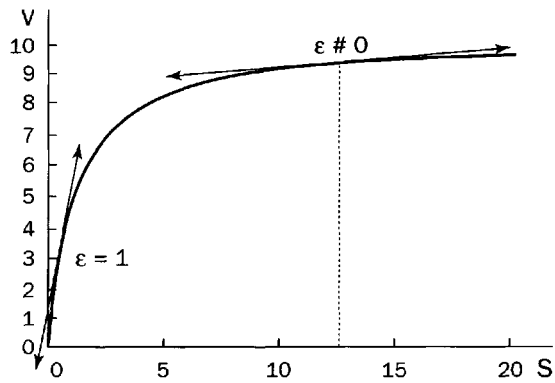


Figure 16 - Coefficients d'élasticité et loi de MICHAELIS-HENRI

On peut calculer la valeur de l'élasticité à partir de l'équation de HENRI-MICHAELIS [HENRI, 1903 et BRIGGS & HALDANE, 1925] :

$$v = \frac{V_M [S]}{K_m + [S]} ; \varepsilon' = \frac{\partial v}{\partial S} = \frac{V_M K_m}{(K_m + [S])^2} = \frac{v}{[S]} \frac{K_m}{K_m + [S]} = \frac{v}{[S]} \frac{E_{libre}}{E_{total}}$$

Dans ce cas l'expression de la forme normalisée du coefficient d'élasticité est plus simple : $\varepsilon = E_{libre}/E_{total}$.

$$\text{Pour } [S] << K_m \text{ , } \varepsilon = 1 \text{ ; pour } [S] >> K_m \text{ , } \varepsilon = 0.$$

Remarque *- les formes normalisées et non normalisées de l'élasticité ne sont pas égales.*

2.2.4. Relations de connexion avec les coefficients de contrôle des flux

Le fait que les pools de métabolites intermédiaires constituent un lien entre les étapes d'un réseau métabolites permet d'imaginer qu'il existe des relations entre les coefficients de contrôle et les coefficients d'élasticité. Ces relations sont appelées justement relations de connexion. On donnera ici leur expression sans démonstration dans le cas d'une chaîne métabolique linéaire.

Equation de Michaelis généralisée

L'équation de MICHAELIS- HENRI généralisée peut s'écrire [HALDANE ,1930] :

$$v = \frac{V_f S/K_S - V_r P/K_P}{1 + S/K_S + P/K_P} = v_f - v_r \qquad (18)$$

avec : $$v_f = \frac{V_f S/K_S}{1 + S/K_S + P/K_P} \text{ et } v_r = \frac{V_r P/K_P}{1 + S/K_S + P/K_P}.$$

GROEN *et al.* (1982b) démontrent que :

$$\varepsilon_S^{\,v} = \frac{\partial \ln v}{\partial \ln S} = \frac{1}{1 - \Gamma/K_{eq}} - \frac{v_f}{Vf} = \frac{1}{1 - \Gamma/K_{eq}} \left(1 - \frac{F}{V_f}\right) \qquad (19)$$

et $$\varepsilon_P^{\,v} = \frac{\partial \ln v}{\partial \ln P} = \frac{-\Gamma/K_{eq}}{1 - \Gamma/K_{eq}} - \frac{v_r}{V_r} = \frac{-\Gamma/K_{eq}}{1 - \Gamma/K_{eq}} \left(1 + \frac{F}{V_r}\right) \qquad (20)$$

avec $K_{eq} = \frac{P_{eq}}{S_{eq}} = \frac{V_f K_P}{V_r K_S}$ (relation de HALDANE) et $\Gamma = \frac{P}{S}$ à l'état stationnaire. F est le flux à l'état stationnaire. Il est égal à la valeur de v pour les concentrations des métabolites de l'état stationnaire.

De manière générale, pour une chaîne métabolique linéaire, ces relations s'écrivent :

$$C'_1 \varepsilon'^{\,1}_i + C'_2 \varepsilon'^{\,2}_i + \ldots + C'_n \varepsilon'^{\,n}_i = 0 \qquad (21)$$

L'indice i est celui du substrat. Il y a autant de relations de connexion que de substrats. Chaque relation exprime la manière dont le substrat i intervient dans le contrôle du flux par l'intermédiaire de ses actions sur les vitesses. Compte tenu de l'équation (17) et du fait que les coefficients de contrôle des flux normalisés et non-normalisés sont identiques pour une chaîne linéaire, on peut aussi écrire avec les coefficients normalisés :

$$C_1 \varepsilon_i^{\,1} + C_2 \varepsilon_i^{\,2} + \ldots + C_n \varepsilon_i^{\,n} = 0 \qquad (22)$$

Dans le cas n = 2, le schéma est représenté ci-dessous :

$$\xrightarrow{v_1} X_1 \xrightarrow{v_2}$$

Il n'y a qu'un métabolite intermédiaire et donc qu'une relation qui s'écrit :

$$C'_1 \varepsilon'^{\,1}_1 + C'_2 \varepsilon'^{\,2}_1 = 0 \qquad (23)$$

ou $$C_1 \varepsilon_1^{\,1} + C_2 \varepsilon_1^{\,2} = 0 \qquad (24)$$

Dans le cas n = 3 , le schéma est représenté ci-dessous :

$$\xrightarrow{v_1} X_1 \xrightarrow{v_2} X_2 \xrightarrow{v_3}$$

Il y a deux métabolites intermédiaires et donc deux relations de connexion qui s'écrivent :

$$\begin{cases} C'_1 \varepsilon'_1{}^1 + C'_2 \varepsilon'_1{}^2 + C'_3 \varepsilon'_1{}^3 = 0 & \text{par rapport à } x_1 \\ C'_1 \varepsilon'_2{}^1 + C'_2 \varepsilon'_2{}^2 + C'_3 \varepsilon'_2{}^3 = 0 & \text{par rapport à } x_2 \end{cases}$$

ou

$$\begin{cases} C_1 \varepsilon_1{}^1 + C_2 \varepsilon_1{}^2 + C_3 \varepsilon_1{}^3 = 0 & \text{par rapport à } x_1 \\ C_1 \varepsilon_2{}^1 + C_2 \varepsilon_2{}^2 + C_3 \varepsilon_2{}^3 = 0 & \text{par rapport à } x_2 \end{cases}$$

2.2.5. Cas de 2 étapes consécutives

Variation des coefficients de contrôle de flux et des élasticités

Nous avons vu que dans le cas d'une voie métabolique linéaire constituée de deux étapes, les relations de connexion s'écrivent :

$$C_1 \varepsilon_1{}^1 + C_2 \varepsilon_1{}^2 = 0 \qquad (24)$$

A partir de l'équation (24), on peut écrire : $\dfrac{C_1}{C_2} = -\dfrac{\varepsilon_1{}^2}{\varepsilon_1{}^1}$ (25)

Le rapport des coefficients de contrôle varie en sens inverse du rapport des coefficients d'élasticités.

Cela restera vrai pour deux étapes adjacentes d'une chaîne linéaire tant qu'il n'y pas d'effet régulateur de métabolites autres que les substrats et produits des deux réactions.

Détermination des coefficients de contrôle

En reprenant la relation de sommation, on peut écrire le système :

$$\begin{cases} C_1 + C_2 = 1 \\ C_1 \varepsilon_1{}^1 + C_2 \varepsilon_1{}^2 = 0 \end{cases}$$

qui permet la détermination des coefficients de contrôle des flux C_1 et C_2.

Même si l'on ne connaît pas la valeur des élasticités, on peut toujours résoudre formellement ces systèmes pour exprimer les coefficients de contrôle :

$$C_1 = -\frac{\varepsilon_1{}^2}{\varepsilon_1{}^1 - \varepsilon_1{}^2} \quad \text{et} \quad C_2 = \frac{\varepsilon_1{}^1}{\varepsilon_1{}^1 - \varepsilon_1{}^2}$$

Dans ce cas particulier, on a les mêmes relations avec les coefficients de contrôle et d'élasticité normalisés et non normalisés.

Comme on l'a dit dans l'introduction de ce chapitre, les coefficients d'élasticité permettent le calcul effectif des coefficients de contrôle. C'est une deuxième manière d'évaluer ces coefficients qui peut être généralisée au point de constituer une définition des coefficients de contrôle. Cela montre aussi que la valeur des coefficients de contrôle est uniquement déterminée par les élasticités [et l'architecture du réseau métabolique ; voir REDER (1988)].

Cas d'une première étape irréversible

Dans le cas où la première étape est irréversible, le métabolite x_1 n'a aucune influence sur cette étape, c'est-à-dire que l'on a : $\varepsilon_1^1 = 0$ et donc d'après la relation de connexion pour les coefficients de contrôle de flux [$C_1 \varepsilon_1^1 + C_2 \varepsilon_1^2 = 0$, équation (24)], $C_2 \varepsilon_1^2 = 0$. Comme en général $\varepsilon_1^2 \neq 0$, cela entraîne $C_2 = 0$ et donc $C_1 = 1$.

Tout le contrôle est porté par la première étape irréversible. Cela restera vrai pour une chaîne linéaire tant qu'il n'y pas d'effet régulateur par les métabolites autres que les substrats et produits des deux réactions : tout le contrôle est situé avant l'étape irréversible. ***Attention***, ce n'est plus vrai si l'étape irréversible est soumise à une régulation par un métabolite du réseau situé après l'étape irréversible, qui permet de « sensibiliser » la première étape à ce qui se passe après.

Cas de la deuxième étape irréversible

Dans ce cas le contrôle peut être partagé par les deux étapes. En effet ε_1^1 et ε_1^2 peuvent être différents de zéro. En particulier, l'étape 1 peut être près de l'équilibre et porter la majorité du contrôle de la chaîne métabolique.

2.2.6. Conclusion

La notion de coefficient d'élasticité est importante : nous avons vu dans des cas simples que l'on peut calculer les coefficients de contrôle à partir des coefficients d'élasticité en se servant des relations de connexion et de sommation. Cette expression des coefficients de contrôle à partir des coefficients d'élasticité est à la base du calcul général des coefficients de contrôle dans le cas d'un réseau métabolique quelconque tel qu'il a été développé par C. REDER (1988).

Nous avons vu l'intérêt des relations de connexion dans le cas d'un réseau métabolique simple – constitué de deux étapes successives – pour comprendre que la répartition du contrôle dépend de la sensibilité des vitesses en fonction des variations de métabolites intermédiaires.

Non seulement, il n'est pas sûr qu'il existe une étape limitante unique, mais de plus, une étape proche de l'équilibre peut être contrôlante [CHASSAGNOLE *et al.*, 2001] et une étape irréversible peut ne pas l'être (à condition d'être en fin de chaîne dans le cas où il n'y a pas de régulations). Cela remet en question un certain nombre de dogmes (admis sans aucune base théorique). Cette remise en question est encore plus nécessaire lorsque l'on considère des réseaux métaboliques complexes.

3. CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

La théorie du contrôle du métabolisme est une théorie qui permet de comprendre le fonctionnement d'un réseau métabolique dans sa globalité, ***du moins au voisinage***

d'un état stationnaire. C'est en effet une théorie de la sensibilité des réseaux métaboliques dans le domaine linéaire au voisinage d'un état stationnaire.

Nous avons vu les importantes conséquences que l'on peut en tirer pour l'étude des réseaux métaboliques connus, en particulier que le contrôle peut être partagé et n'est en général pas limité à une étape unique. Le concept d'étape limitante unique est faux dans la plupart des cas.

On peut s'attendre à une application plus vaste de la théorie du contrôle du métabolisme. Au fur et à mesure du séquençage des **génomes** on peut construire les réseaux métaboliques correspondants. Cette construction ne donne qu'une image très statique du métabolisme. Il est nécessaire de connaître non seulement les enzymes intervenantes, repérées par leurs gènes, mais aussi leurs cinétiques si l'on veut déterminer les flux qui traversent le réseau métabolique. Il s'agit d'une tâche colossale qui pourra sans doute être plus ou moins automatisée.

Cependant, pour avoir une idée de l'évolution d'un réseau métabolique au voisinage d'un état stationnaire, il n'est pas nécessaire de connaître complètement les cinétiques enzymatiques pour une large gamme de concentrations en substrats et produits de la réaction. Les valeurs des vitesses et de leurs variations (élasticités) au voisinage des points stationnaires suffisent comme nous l'avons vu pour déterminer les coefficients de contrôle de flux [et de substrats dont nous n'avons pas parlé (voir REDER, 1988)]. La détermination des coefficients d'élasticité et des coefficients de contrôle à partir d'expériences globales d'analyse de flux est plus simple que la détermination individuelle des cinétiques enymatiques pour de larges variations des substrats et produits. Une approche intéressante pour cette détermination est la méthode de modulation multiple proposée par KASCER et BURNS (1979) puis développée par GIERSH (1994) (voir aussi GIERSH & CORNISH-BOWDEN, 1996) et appliquée de manière très élégante par AINSCOW et BRAND (1999).

Ce type d'analyse, à la fois théorique et expérimentale pourrait fournir une première description systématique de la dynamique quantitative des réseaux métaboliques déduits de la génomique.

RÉFÉRENCES

E.K. AINSCOW & M.D. BRAND - Top-down control analysis of ATP turnover, glycolysis and oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **263**, 671-685 (1999).

G.E. BRIGGS & J.B.S. HALDANE - A note on the kinetics of enzyme action. *J. Biochem.* **19**, 338-339 (1925).

C. CHASSAGNOLE, A. DAVID, D.A FELL, B. RAÏS & J.P. MAZAT - Control of the threonine synthesis pathway in *Escherischia coli*: a theoretical & experimental approach. *J. Biochem.* **356**, 433-444 (2001).

C. GIERSCH - Determining elasticities from multiple measurements of steady-state flux rates ans metabolite concentrations : theory. *J. Theor. Biol.* **169**, 88-99 (1994).

C. GIERSCH & A. CORNISH-BOWDEN - Extending double modulation : combinatorial rules for identifying the modulations necessary for determining elasticities in metabolic pathways. *J. Theor. Biol.* **182**, 361-369 (1996).

A. GROEN, R.J.A. WANDERS, H.V. WESTERHOFF, R. VAN DER MEER & J.M. TAGER - Quantification of the contribution of the various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* **257**, 2754-2757 (1982a).

A. GROEN, R.J.A. WANDERS, H.V. WESTERHOFF, R. VAN DER MEER, J.M. TAGER & T.P.M. AKERBOO - Control of Metabolic Fluxes. *In : Metabolic compartmentation*. Ed. Sies, Academic Press, 9-37 (1982b).

J.B.S. HALDANE - *Enzymes*. Longmans and Green, London (1930).

R. HEINRICH & T.A. RAPOPORT - A linear steady-state treatment of enzymatic chains. *Eur. J. Biochem.* **42**, 89-95 (1974).

V. HENRI - *Lois générales de l'action des diastases*. Thèse, Paris (1903).

V. HENRI - Théorie générale de l'action de quelques diastases. *C.R. Acad. Sci.* Paris, 916-919 (1902).

J. HIGGINS - Analysis of sequential reactions. *Ann. New-York Acad. Sci.* **108**, 305-321 (1963).

J. HIGGINS - Dynamic and control in cellular reactions. *In : Control of energy metabolism*, B. CHANCE, R.W. ESTABROOK & J.R. WILLIAMSON eds, 13-46 (1965).

H. KACSER & J.A. BURNS - Control of metabolism. *In : Control of biological processes*, D.D. DAVIES ed. Cambridge University Press, Cambridge, 65-104 (1973).

H. KACSER & J.A. BURNS - Molecular democracy : who shares the controls ? *Biochem. Soc. Trans.* **7**, 1149-1160 (1979).

H. KACSER & J.A. BURNS - The Molecular basis of dominance. *Genetics* **97**, 639-666 (1981).

T. LETELLIER, M. MALGAT & J.P. MAZAT - Control of oxidative phosphorylation in rat muscle mitochondria: implications for mitochondrial myopathies. *Biochim. Biophys. Acta* **1141**, 58-64 (1993).

T. LETELLIER, R. HEINRICH, M. MALGAT & J.P. MAZAT - The kinetic basis of the threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochem. J.* **302**, 171-174 (1994).

J.P. MAZAT, R. ROSSIGNOL, M. MALGAT, C. ROCHER, B. FAUSTIN & T. LETELLIER - What do mitochondrial diseases teach us about normal mitochondrial functions... that we already knew: threshold expression of mitochondrial defects. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 20-30 (2001).

L. MICHAELIS & M.L. MENTEN - Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **49**, 333-369 (1913).

C. REDER - Metabolism control theory : a structural approach. *J. Theor. Biol.* **135**, 175-201 (1988).

M. RIGOULET, N. AVERET, J.P. MAZAT, B. GUERIN & F. COHADON - Redistribution of the flux-control coefficients in mitochondrial oxidative phosphorylations in the course of brain edema. *Biochim. Biophys. Acta* **932**, 116-123 (1988).

N. TORRES, F. MATEO, E. MELENDEZ-HEVIA & H. KACSER - Kinetics of metabolic pathway. *Biochem. J.* **234**, 169-174 (1986).

POUR EN SAVOIR PLUS

A. CORNISH-BOWDEN & M.L. CARDENAS - Control of Metabolic Processes. *Nato Asi Series* **190**, Plenum-Press, New York & London (1990).

A. CORNISH-BOWDEN & M.L. CARDENAS - Technological & Medical Implications of Metabolic Contgrol Analysis. *Nato Asi Series 3* **74**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London (2000).

D. FELL - *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press, London & Miami (1996).

R. HEINRICH & S. SCHUSTER - *The regulation of cellular systems*. ITP Chapman & Hall Eds, New York (1996).

J.-P. MAZAT & C. REDER eds - *Contrôle du métabolisme cellulaire*. Bordeaux 16-17 Octobre (1987).

S. SCHUSTER, M. RIGOULET, R. OUHABI & J.P. MAZAT - *Modern Trends in Biothermokinetics*, Vol 2. Plenum Press (1993).

Numéros spéciaux de revues :
Acta Biotheoretica **41**(1/2), June (1993).
Journal of Theoretical Biology **182**(3), October, Academic Press (1996).

ANNEXE VII

PRINCIPALES LINÉARISATIONS DE L'ÉQUATION DE MICHAELIS-HENRI

Jean-Pierre MAZAT

A1. LINÉARISATION DE LINEWEAVER ET BURK

C'est la plus populaire et la plus mauvaise.

De l'équation (3), on tire en inversant les rapports :

$$\frac{V_M}{v} = \frac{K_m + [S]_0}{[S]_0} = \frac{K_m}{[S]_0} + 1$$

soit

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_M}\frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_M}.$$

En prenant comme nouvelles variables : $Y = \frac{1}{v}$ et $X = \frac{1}{[S]_0}$, on obtient : $Y = \frac{K_m}{V_M}X + \frac{1}{V_M}$, c'est-à-dire l'équation d'une droite dont l'ordonnée à l'origine est $\frac{1}{V_M}$ et qui coupe l'axe des abscisses au point $X = -\frac{1}{K_m}$ (figure AVIIa).

On se rendra compte facilement sur l'exemple de la figure AVII que cette représentation qui accumule sur l'axe des ordonnées les points correspondants à $[S]_0$ élevé et donne une importance exagérée aux points obtenus à $[S]_0$ faible est une mauvaise représentation.

A2. LINÉARISATION D'EADIE-HOFSTEE

L'équation (5) peut aussi s'écrire

$$v = \frac{V_M [S]_0}{K_m + [S]_0} = \frac{V_M (K_m + [S]_0) - V_M K_m}{K_m + [S]_0}$$

soit :

$$v = V_M - K_m \frac{V_M}{K_m + [S]_0} = V_M - K_m \frac{v}{[S]_0}$$

En posant $Y = \frac{v}{[S]_0}$ et $X = v$, on obtient l'équation d'une droite (figure AVIIb) :

$$Y = \frac{v}{[S]_0} = -\frac{1}{K_m} X + \frac{V_M}{K_m}.$$

A3. LINÉARISATION DE HANES-WOOLF

L'équation (5) peut encore s'écrire :

$$\frac{[S]_0}{v} = \frac{K_m}{V_M} + \frac{[S]_0}{V_M}$$

et, en prenant $Y = \frac{[S]_0}{v}$ et $X = [S]_0$, on obtient la droite représentée sur la figure AVIIc.

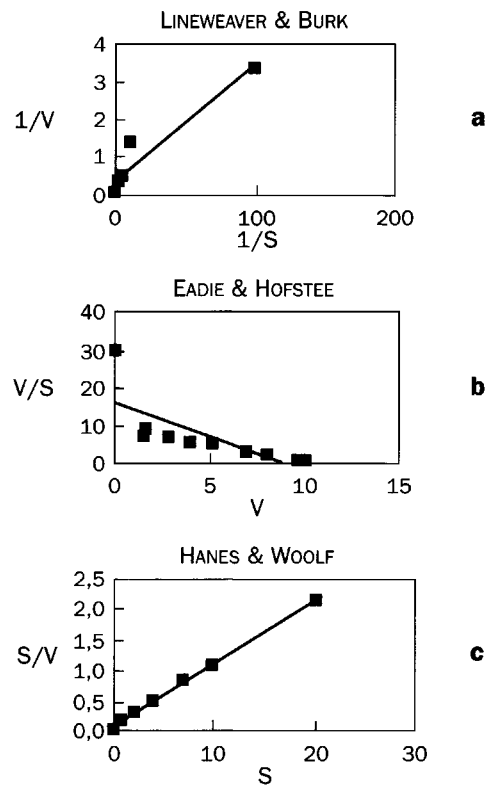


Figure AVII - Linéarisations classiques de l'équation de MICHAELIS-HENRI

A4. PRÉCISION DES EXPRESSIONS LINÉARISÉES

Le tableau 1 donne les paramètres V_M et K_m déterminés dans ces représentations linéaires en utilisant la droite des moindres carrés (en Y) passant par les points transformés. On comprendra facilement que la première représentation devrait être éliminée et que seule la dernière peut être retenue. C'est le contraire qui se passe habituellement. Dans tous les cas, on utilisera plutôt les valeurs brutes (non transformées) avec un programme d'identification de paramètres non linéaire.

Tableau 1 - Valeurs de K_m et V_M obtenues par différents procédés pour une série de points « expérimentaux »

			$y = a + bx$	
	K_m	V_M	a	b
Valeurs initiales	1	10		
Identification des paramètres	1,07	9,85		
LINEWEAVER & BURK	0,12	3,8	0,26	0,0317
EADIE & HOFSTEE	0,56	8,92	15,97	– 1,79
HANES & WOOLF	0,9	9,84	0,0915	0,102

Les points « expérimentaux » ont été fabriqués à partir de l'équation de MICHAELIS-HENRI [équation (5)] avec $K_m = 1$ et $V_M = 10$ puis en ajoutant ou retranchant alternativement 0,2 aux valeurs obtenues pour simuler une erreur aléatoire sur la mesure.

Chapitre VIII

ELÉMENTS D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE

Alain BARDOU

1. DES ORIGINES AU CONCEPT DE POTENTIEL D'ACTION

Les phénomènes de nature électrique sont connus depuis l'antiquité. Reliés aux phénomènes naturels et au vivant, on leur reconnaît essentiellement quatre origines : la magnétite, l'ambre [1], les éclairs et la décharge du poisson torpille, sans pour autant que l'homme n'ait conscience des relations susceptibles d'exister entre ces différentes manifestations. La décharge du poisson torpille (*Torpedo marmorata*) était connue de longue date et déjà utilisée par les grecs anciens pour traiter les maux de tête, l'épilepsie et les douleurs de l'accouchement [AMBERSON, 1958].

Les premiers effets physiologiques directs de l'électricité ont été mis en évidence par Leopoldo CALDANI en 1756 : celui-ci démontra que la décharge d'une bouteille de LEYDE induisait l'excitation d'un nerf ou d'un muscle isolé. Ces observations furent rapportées ultérieurement par son principal élève, Luigi GALVANI [GALVANI, 1791], qui réalisa dans son laboratoire en 1780 la première de ses expériences classiques sur la contraction nerf-muscle (figure 1).

Selon GALVANI lui-même : *l'expérience s'est déroulée de la façon suivante : J'avais disséqué et préparé une grenouille... Ayant beaucoup d'autres choses en tête, je la plaçais sur la même table qu'une machine électrique, l'animal en étant totalement séparé et à distance respectable des conducteurs de cette machine. Un de mes assistants appliqua doucement la pointe d'un scalpel sur le nerf crural... Soudainement, tous les muscles se contractèrent violemment comme pris de convulsions extrêmement toniques. Un autre de mes assistants, qui était généralement présent au cours de nos expériences sur l'électricité, remarqua judicieusement que ce phénomène s'était produit au moment exact où une étincelle avait jailli entre la machine électrique et le scalpel, passant à proximité de l'un de ces conducteurs...* [GALVANI, 1794].

---

1. L'ambre est une résine fossile qui présente des propriétés électrostatiques au frottement.

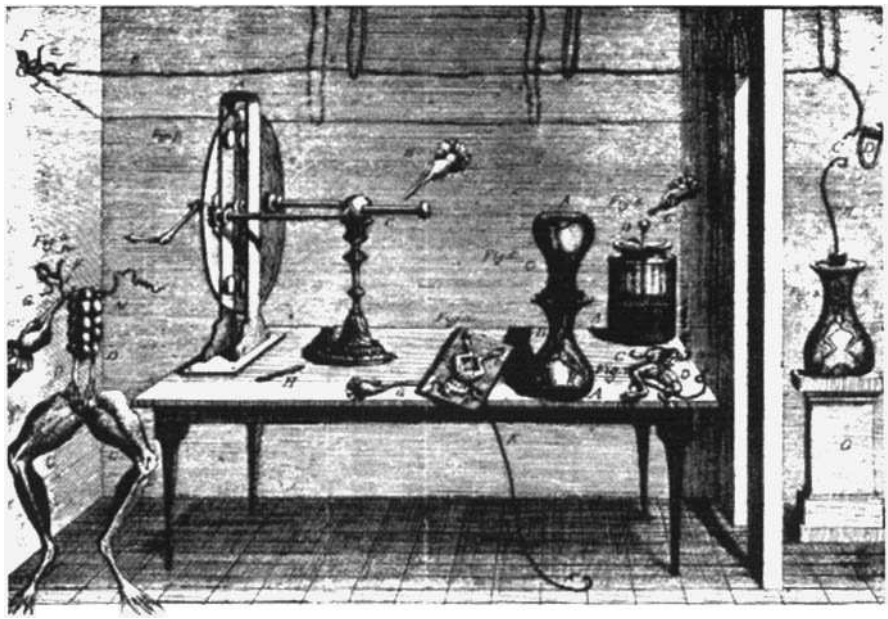


Figure 1 - Dessin de GALVANI représentant son propre laboratoire incluant une machine électrostatique à friction

Le concept de sources possibles d'électricité dans le règne animal fut généralisé au milieu du XIXe siècle par les travaux de Carlo MATTEUCCI, qui montra en 1838 qu'une différence de potentiel existait entre un nerf et son muscle lésé [EINTHOVEN, 1895].

Il mit également en évidence l'existence d'un « courant électrique de contraction » au niveau de toutes les masses musculaires, dont le cœur [MATTEUCCI, 1842].

En 1843, DU BOIS-REYMOND montra qu'il existait également un courant de repos au niveau des muscles, celui-ci diminuant avec leur contraction. Il dénomma cette diminution en utilisant un terme qui survivra jusqu'à l'époque actuelle, celui de « potentiel d'action » [DU BOIS-REYMOND, 1848-1860].

En 1875, Gabriel LIPPMANN (le père du premier principe de photographie couleur par transparence) réalisa le premier un instrument capable d'enregistrer le potentiel émis par le cœur. Alors qu'il travaillait dans le laboratoire de KIRCHHOFF à HEIDELBERG, il fit une étude systématique de la contraction du mercure[2], recouvert d'acide sulfurique dilué, en fonction de la différence de potentiel existant entre ces deux composants. Il utilisa ensuite ces résultats pour mettre au point un

2. En fait, la position du ménisque de la colonne de mercure dépend de la tension superficielle existant à l'interface entre le mercure et l'acide et LIPPMANN avait observé qu'il existe des mouvements du ménisque lorsque cette tension superficielle est modifiée par l'application d'une différence de potentiel entre l'acide et le mercure. La projection d'une image amplifiée du ménisque sur papier sensible permettait d'obtenir un signal représentatif de la différence de potentiel appliquée.

électromètre capillaire reposant sur ce principe [LIPPMANN, 1875]. Bien que cet électromètre permit d'obtenir les premiers enregistrements satisfaisants de l'activité électrique cardiaque, une grande variabilité des enregistrements est apparue, due aux effets inertiels de friction du mercure en fonction de l'état de surface du tube capillaire, de ses variations même faibles de diamètre, du degré d'amplification, de la rapidité de la plaque photosensible...

EINTHOVEN travailla beaucoup à l'amélioration des performances de l'électromètre capillaire dont les enregistrements faisaient originellement apparaître 4 déflexions principales A, B, C, D, (correspondant grossièrement aux ondes P, Q, R et T de l'actuel électrocardiogramme ou ECG).

Cette nomenclature a été conservée jusqu'à l'heure actuelle où l'on considère les ondes P, Q, R, S et T comme constituants principaux de l'ECG.

A la fin du XIXe siècle, survinrent des évènements totalement étrangers à la médecine et à l'électrophysiologie, mais néanmoins de première importance dans le développement de l'électrocardiographie.

Un effort considérable était, à cette époque, mené sur le développement du téléphone et du télégraphe et KELVIN consacrait ses efforts au développement du savoir et des instruments nécessaires à l'immersion de câbles sous-marins transatlantiques. En 1897, Clément ADER (père de l'avion) inventa un nouveau type de galvanomètre, le « galvanomètre à corde » [ADER, 1897], susceptible d'amplifier les signaux au niveau de ces câbles. Ce nouveau galvanomètre, permettant d'obtenir une réponse en fréquence atteignant 1600 signaux par minute, a immédiatement été utilisé sur les câbles reliant Brest à Saint-Pierre et Marseille à Alger.

La contribution fondamentale de EINTHOVEN à l'électrocardiographie, après l'important travail effectué à partir de l'électromètre de LIPPMANN, a été de reconnaître immédiatement la valeur potentielle du nouveau galvanomètre de Clément ADER et d'entreprendre personnellement la construction d'un modèle plus fiable et plus sensible de cette machine [EINTHOVEN, 1901]. Il publia en 1913 des tracés, obtenus au moyen de cette technologie [EINTHOVEN, 1913], correspondant parfaitement aux tracés électrocardiographiques actuels (figure 2) et reçut, en 1924, le prix NOBEL de physiologie et médecine pour « la découverte du mécanisme de l'électrocardiogramme ».

Si, dès 1913, l'expression des phénomènes électriques était parfaitement connue au niveau du cœur, c'est-à-dire de l'organe, il fallut attendre plus de 20 ans pour atteindre le même niveau de connaissance à l'échelle de la cellule (cellule nerveuse et cellule cardiaque). Deux étapes majeures, réalisées entre 1936 et 1950, ont permis la validation expérimentale de la théorie du potentiel d'action par enregistrement direct de la polarisation de la membrane cellulaire au repos et des potentiels d'action. Elles ont ainsi clairement établi les bases de l'électrophysiologie actuelle.

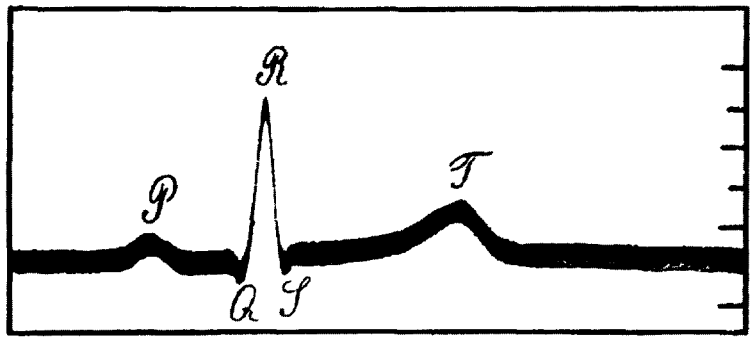


Figure 2 - Potentiels électriques enregistrés entre la surface des deux bras au moyen d'un galvanomètre à corde (figure originale de EINTHOVEN publiée en 1913)
Echelle de temps : 50 ms/division, échelle de potentiel :0,5 mV/division

La première de ces étapes fondamentales a pour objet d'étude la cellule nerveuse et plus précisément l'un de ses prolongements spécifique, l'axone (voir chapitre X). Elle est due à J.Z. YOUNG, qui, au début des années 1930 [YOUNG, 1936], « redécouvrit » l'axone géant du calmar[3], qui par ailleurs était bien connu des zoologistes. Il réintroduisit cette fibre nerveuse d'environ 0,5 mm de diamètre (20 fois supérieure à un axone de lapin) comme matériel expérimental de choix en neurophysiologie. L'utilisation de cette fibre d'énorme dimension permettait d'effectuer des prélèvements au niveau de l'axoplasme[4], de déterminer son contenu en ions, **protéines**... Il s'est avéré possible d'isoler cette fibre et de la maintenir en état de survie durant plusieurs heures. Une électrode de taille raisonnable pouvait ainsi être introduite dans l'axone, permettant pour la première fois d'accéder à la mesure directe du **potentiel transmembranaire** au repos, du potentiel d'action, ainsi que des propriétés électriques liées à la membrane telles que sa résistance, sa conductance, sa capacitance... Ces expériences ont principalement été réalisées par A.L. HODGKIN et A.F. HUXLEY dès le début des années 1940 [HODGKIN & HUXLEY, 1949]. Leurs expériences, menées sur une quinzaine d'années, les a conduit à publier entre 1948 et 1952 leur théorie ionique de la genèse du potentiel d'action au niveau membranaire, travail fondateur de l'électrophysiologie moderne. Ce travail a été couronné par le prix NOBEL en 1952.

La deuxième étape (technologique) majeure a permis l'obtention de résultats expérimentaux similaires sur la cellule cardiaque. Elle a été franchie par LING et GÉRARD en 1949 avec l'utilisation d'une micro-électrode fine. Celle-ci est constituée d'une fibre de verre étirée dont la dimension (diamètre) au niveau de la pointe est de l'ordre du micromètre et qui est remplie de chlorure de potassium à

3. Le calmar est un mollusque céphalopode, voisin de la seiche, qui présente la particularité de posséder au niveau du manteau une fibre nerveuse de dimension très importante, tant au plan de la longueur que du diamètre, dénommée « axone géant ». Cette fibre a représenté un matériel expérimental de choix dans le domaine de l'électrophysiologie nerveuse.

4. L'axoplasme est le nom particulier donné au **cytoplasme** contenu dans la partie allongée (axone) de la fibre nerveuse.

une concentration de 3 molaire. La possibilité d'introduire ce type d'électrode dans une cellule sans la léser a permis de réaliser un ensemble de mesure sur des cellules nerveuses et cardiaques (potentiel transmembranaire au repos et en activité), ce qui n'avait jusqu'alors été possible que sur l'axone de calmar du fait de ses dimensions importantes. La technique de la « microélectrode flottante » [LING & GÉRARD, 1949] a même permis d'enregistrer l'évolution du potentiel transmembranaire au cours de la contraction des cellules cardiaques (cardiomyocytes) (figure 3).

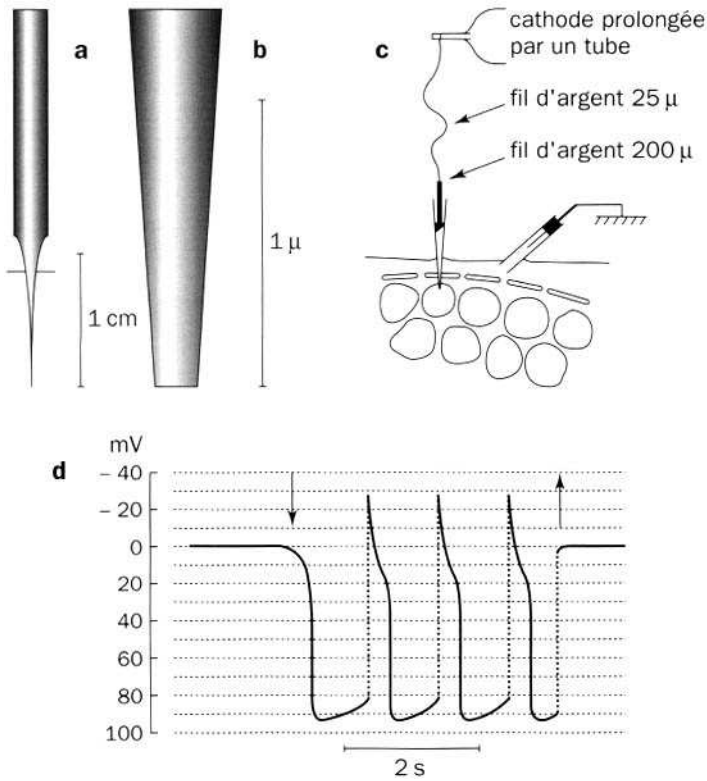


Figure 3

a - principe de la microélectrode de LING et GÉRARD
b - micrographie de la pointe d'une microélectrode
c - technique de la microélectrode flottante permettant d'enregistrer l'activité cellulaire sur cœur battant
d - potentiels d'action enregistrés sur fibres de PURKINJE (voir chapitre IX, § 2) au moyen d'une microélectrode

Dès 1951, la microélectrode était appliquée avec succès pour étudier la contraction du ventricule de grenouille [WOODBURY *et al.*, 1951], les fibres isolées de PURKINJE (voir chapitre IX, § 2) de chien [DRAPER & WEIDMAN, 1951] et très rapidement l'ensemble des cellules excitables [5].

5. Les cellules excitables sont les cellules susceptibles de fournir une réponse électrique entraînant ou non une réponse mécanique lorsqu'elles sont soumises à une stimulation. Les principales cellules excitables sont les cellules nerveuses cardiaques et musculaires (squelettiques ou lisses).

L'existence d'un potentiel de repos E chez l'ensemble des cellules excitables a très rapidement été mise en évidence à partir de cette technique (figure 4).

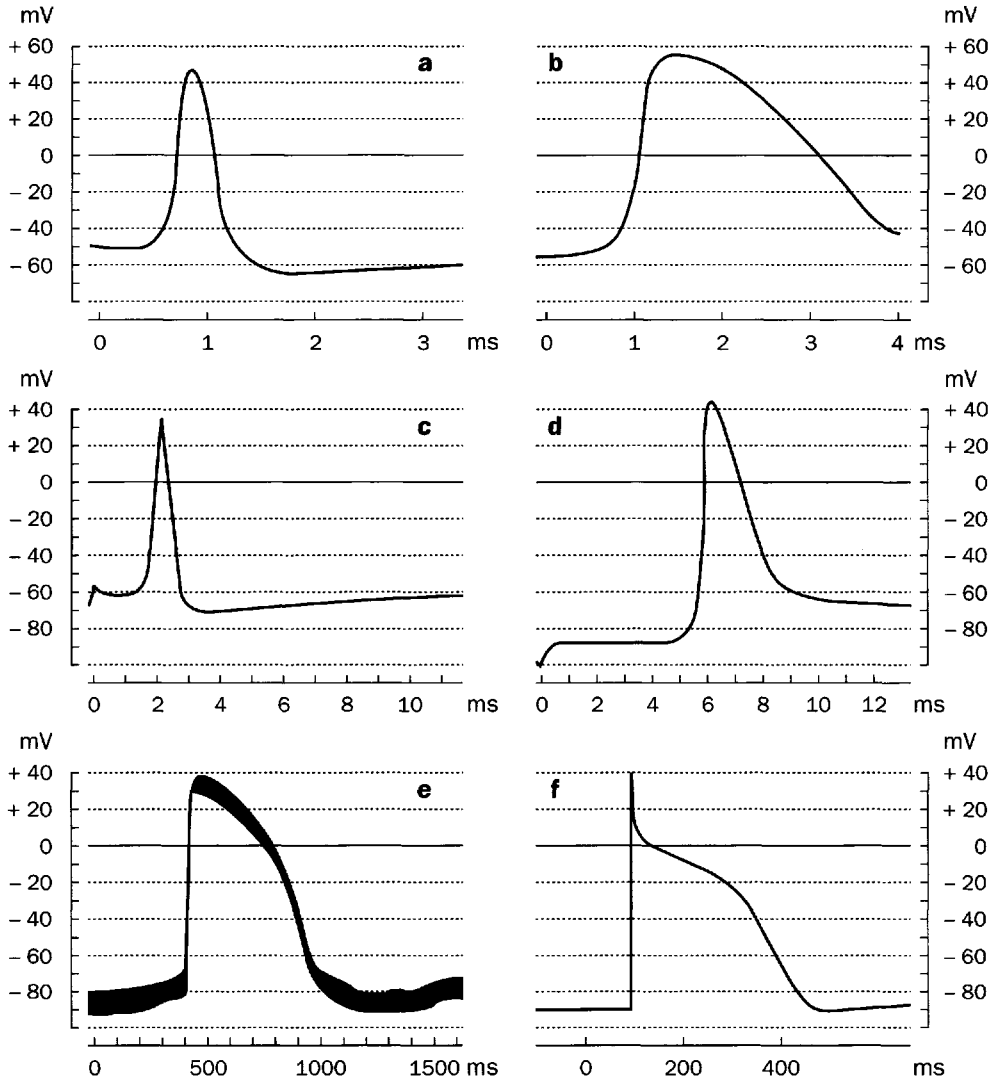


Figure 4 - Potentiels de repos et potentiels d'action enregistrés au moyen de microélectrodes de LING et GÉRARD

a - **b** - **c** - axone géant de calmar (d'après HODGKIN & HUXLEY, 1952a).
d - muscle squelettique de grenouille (*Sartorius*) (d'après HODGKIN & HOROWICZ, 1957)
e - ventricule de grenouille (d'après WOODBURY *et al.*, 1951)
f - fibres de PURKINJE de chien (d'après DRAPER & WEIDMAN, 1951)

Selon la théorie de BERNSTEIN [BERNSTEIN, 1910], ce potentiel de repos est principalement dû à une différence très importante entre les concentrations de potassium intracellulaires ($[K^+]_{int}$ = 140 meq[6]) et extracellulaires ($[K^+]_{ext}$ = 4 meq)

6. meq = abréviation de milli-équivalent.

alors que la membrane possède une perméabilité potassique. La valeur de ce potentiel de repos est parfaitement donnée par l'équation de Nernst :

$$E = (RT/nF) \log ([K^+]_{int} / [K^+]_{ext})$$

Les différences principales concernant la durée et la morphologie des potentiels d'action de la fibre nerveuse, cardiaque ou du muscle squelettique ont également été rapidement établies à partir de ces travaux (figure 4). Parallèlement, les différences importantes (figure 5) qui existent entre les potentiels d'action des divers tissus constitutifs du cœur (myocarde auriculaire, ventriculaire, tissu de conduction, zones d'automatisme... voir chapitre IX) ont été rapportées, bien que leur interprétation n'ait été que beaucoup plus tardive

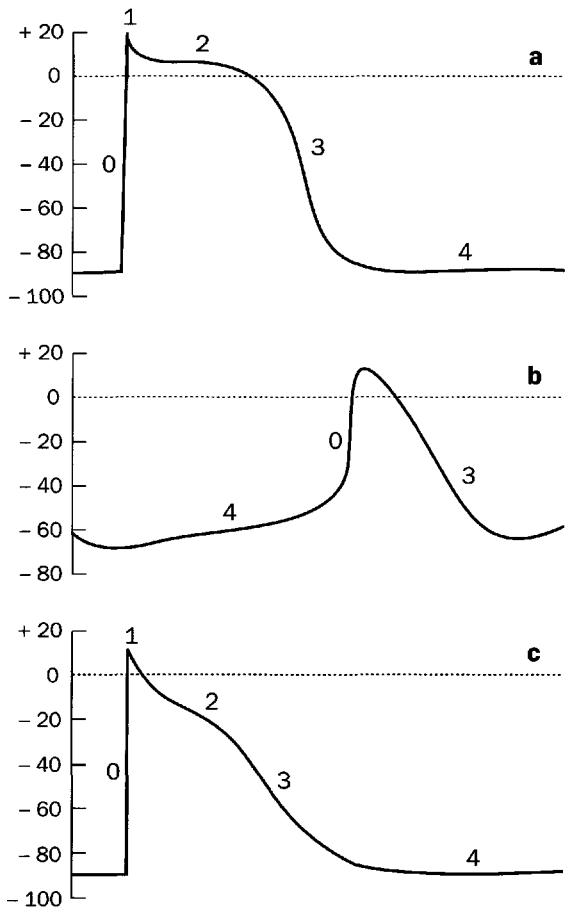


Figure 5 - Tracés de potentiels d'action typiques enregistrés au niveau de cellules myocardiques ventriculaires (a), du nœud sinusal (b) (voir chapitre IX) **et de l'oreillette (c)** (d'après HOFFMAN & CRANEFIELD, 1960)

a - c - 0 : phase rapide de dépolarisation - 1 : amplitude maximale du potentiel d'action 2 : plateau de potentiel d'action - 3 : phase de repolarisation - 4 : potentiel de repos

b - la phase de dépolarisation (0) est plus lente que sur les potentiels d'action myocardiques auriculaire et ventriculaire (dV/dt plus faible), le potentiel de repos (4) est instable, présentant une perte de dépolarisation lente.

Nous avons indiqué que les processus membranaires responsables de la genèse de l'ensemble de ces potentiels d'action ont parfaitement été explicités, dans le cas de l'axone géant de calmar, par la théorie d'HODGKIN-HUXLEY. Ils ont été élargis et généralisés aux autres cellules excitables, en particulier les cellules cardiaques, par différents chercheurs dont Denis NOBLE [NOBLE, 1975], BEELER et REUTER [BEELER & REUTER, 1977] et plus récemment LUO et RUDY [LUO & RUDY, 1991]. L'ensemble de ces travaux représentent définitivement les fondements de notre connaissance actuelle en électrophysiologie. Les paragraphes suivants vont développer de manière plus explicite les bases théoriques de ces théories fondatrices de l'électrophysiologie.

2. *LA THÉORIE IONIQUE DU POTENTIEL TRANSMEMBRANAIRE DE HODGKIN ET HUXLEY*

HODGKIN et HUXLEY [HODGKIN & HUXLEY, 1952] considèrent le potentiel d'action nerveux comme résultant de courants ioniques transmembranaires principalement dus au sodium (courant entrant = dépolarisation) et au potassium (courant sortant = re-polarisation). Ils considèrent que le courant peut traverser la membrane soit en chargeant la capacité membranaire, soit par mouvements d'ions, de telle sorte que le courant transmembranaire total I s'écrit comme la somme :

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + I_i$$

où I_i est le courant ionique, V l'écart du potentiel de membrane par rapport au potentiel de repos et C_m la capacité membranaire par unité de surface.

Pour HODGKIN et HUXLEY, le courant ionique se répartit entre différentes composantes correspondant au flux des ions Na^+ (I_{Na}) et K^+ (I_K) d'une part, à l'existence d'un faible courant de fuite I_L, dû principalement aux ions Cl^-, d'autre part. Dans ces conditions :

$$I_i = I_{Na} + I_K + I_L$$

conformément au circuit électrique équivalent représenté sur la figure 6. Il est important de noter que dans la littérature, tous les modèles représentant schématiquement la membrane cellulaire à partir de ce type de circuit équivalent (une capacité C_m en parallèle avec des sources de courant ioniques) peuvent être décrits comme modèles de HODGKIN-HUXLEY, même si les équations décrivant les sources ioniques sont différentes de celles proposées par HODGKIN-HUXLEY pour l'axone géant de calmar.

Les courants ioniques I_{Na}, I_K et I_L sont déterminés par une force motrice correspondant à la différence de potentiel de membrane et un coefficient de perméabilité membranaire qui a la dimension d'une conductance g de façon que :

$$I_{Na} = g_{Na} (E - I_{Na})$$

$$I_K = g_K (E - I_K)$$

$$I_L = \overline{g_L} (E - E_L)$$

où E_{Na}, E_K et E_L sont les potentiels d'équilibre pour Na^+, K^+ et Cl^- donnés par l'équation de NERNST, les différents paramètres g (1/R) étant les conductances ioniques membranaires pour les ions correspondant. La variable E définit la valeur instantanée du potentiel de membrane.

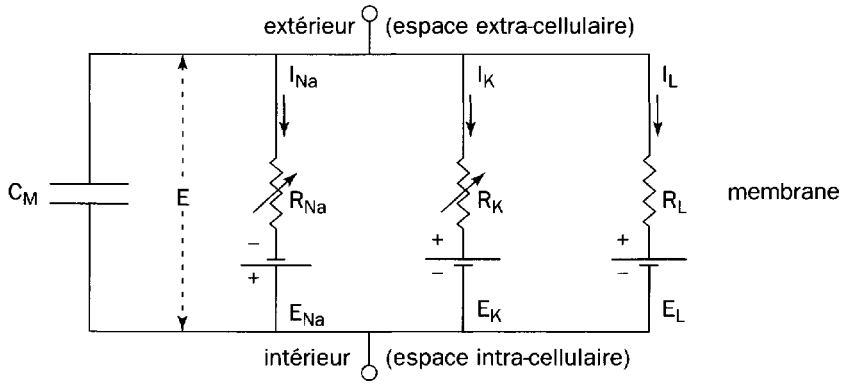


Figure 6 - Circuit équivalent représentant la membrane de l'axone géant
(d'après HODGKIN & HUXLEY, 1952)

Les résultats expérimentaux obtenus par HODGKIN et HUXLEY les ont conduit à considérer que E_{Na}, E_K et E_L, C_m, et g_L pouvaient être considérés comme des constantes, tandis que g_{Na} et g_K variaient à la fois en fonction du temps et du potentiel de membrane.

De plus, HODGKIN et HUXLEY supposèrent que la perméabilité membranaire dépend de l'état ou de la position de groupes de molécules chargées à l'intérieur de la membrane. Ils assimilèrent ces sites à des canaux contrôlés par des portes chargées dont le nombre N est constant et limité pour un élément donné de surface membranaire (par souci de simplification, ce nombre N est normalisé à 1). Les mouvements d'ions sont donc dépendant de l'état de conduction de ces canaux. HODGKIN et HUXLEY postulèrent que les portes ne peuvent occuper que deux états : un état disponible ou état ouvert (α) et un état indisponible ou état fermé (β). Dans la mesure où les portes sont chargées, le nombre de portes dans l'état α ou β dépend du potentiel.

2.1. LE COURANT POTASSIQUE

On considère tout d'abord que chaque canal est commandé par une seule porte. Pour une valeur donnée du potentiel de membrane, on désignera par n la proportion de sites (ou canaux) dans l'état α. Le nombre total N de sites étant normalisé à 1, il y a donc (1 – n) sites dans l'état β pour un élément donné de surface membranaire.

Pour la valeur $E = E_R$ du potentiel de repos, le nombre $n = n_0$ est très petit, donc $(1 - n_0)$ est proche de 1. Si la membrane est brusquement dépolarisée, n_0 tend vers une valeur n supérieure à n_0. Un certain nombre de sites β se sont donc transformés en sites α avec une vitesse de conversion α_n ; de la même façon, la vitesse de conversion des sites α en sites β est dénommée β_n.

Les vitesses de conversion α_n et β_n ont des valeurs qui sont dans le rapport du nombre de sites α et β, soit :

$$\frac{\alpha_n}{\beta_n} = \frac{n}{(1-n)} \tag{1}$$

Si on applique brusquement une dépolarisation à la membrane, la variation de n peut s'écrire :

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(1-n) - \beta_n n \tag{2}$$

Une fois la conversion terminée ($dn/dt = 0$), n prend la valeur stationnaire n_∞ donnée par l'égalité :

$$n_\infty = \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n} \tag{3}$$

Si on admet que chaque état α se convertit en un état β, la transition d'une valeur stationnaire n_0 à une autre valeur stationnaire n_∞ suit une variation exponentielle de constante de temps τ_n correspondant au rapport inverse de la somme des vitesses de conversion, soit $\tau_n = 1/(\alpha_n + \beta_n)$.

Dans ces conditions, si l'on applique un échelon de potentiel, la variation de n sera donnée par l'égalité :

$$n = n_0 + (n_\infty - n_0)(1 - e^{-t/\tau_n}) \tag{4}$$

A l'interruption de l'échelon rectangulaire de potentiel imposé, au moment où le courant K^+ est maximum, la décroissance de n suivra l'équation :

$$n = n_\infty - (n_\infty - n_0)e^{-t/\tau_n} \tag{5}$$

2.2. EXPÉRIENCES DE VOLTAGE-CLAMP ET MODIFICATIONS ASSOCIÉES DU MODÈLE THÉORIQUE

La méthode du « voltage-clamp » consiste à imposer un échelon de potentiel à la membrane et à étudier les courants trans-membranaires résultants. Les résultats expérimentaux obtenus par HODGKIN et HUXLEY dans ces conditions d'application d'un potentiel montrèrent que la montée du courant potassique a l'allure d'une sigmoïde, alors que la phase de retour correspond bien à une relaxation exponentielle. Or les équations précédentes ne permettent pas de rendre compte de ce phénomène si l'on admet que la perméabilité membranaire au potassium est simplement proportionnelle à n.

Ces résultats expérimentaux ont donc conduit HODGKIN et HUXLEY à considérer que chaque site est représenté par un canal doté d'un nombre X de portes et non plus d'une porte unique.

Dans ces conditions, les équations (4) et (5) deviennent :

$$n = n_0 + (n_\infty - n_0)(1 - e^{-t/\tau_n})^X \quad (6)$$

$$n = n_\infty - (n_\infty - n_0)(1 - e^{-t/\tau_n})^X \quad (7)$$

l'équation (6) décrivant une courbe sigmoïde et l'équation (7) une exponentielle.

La valeur de l'exposant X est représentative du délai de variation de la perméabilité au potassium en fonction du temps t = 0 de l'application de l'échelon de potentiel.

Ce délai sera d'autant plus important que X sera grand.

En utilisant la méthode du voltage-clamp, HODGKIN et HUXLEY ont mesuré les variations expérimentales de la conductance g_K obtenues par application à l'axone géant de calmar d'échelons de potentiel de différentes valeurs. Ils ont ensuite comparé ces résultats aux familles de courbes décrites par l'équation (6) pour différentes valeurs de X tout en fixant τ_n, sa valeur expérimentale. Ils en ont déduit que la meilleure correspondance était obtenue pour X = 4 ce qui signifie que la conductance g_K est proportionnelle à n^4 dans le cas de l'axone géant soit :

$$g_K = \overline{g_K} \cdot n^4$$

l'évolution temporelle de n étant par ailleurs donné par l'équation (2).

2.3. LE COURANT SODIQUE

Au cours de ces mêmes expériences de voltage-clamp sur l'axone géant, HODGKIN et HUXLEY ont pu constater que le comportement de la conductance g_{Na} durant la phase initiale suivant l'application de l'échelon de dépolarisation se traduisait également par une variation d'allure sigmoïdale du courant sodique.

Par analogie avec le modèle proposé pour les canaux potassiques, l'équation d'évolution et l'état stationnaire de la variable m sont donnés par les équations :

$$g_K = \overline{g_K} \cdot n^4 \quad \frac{dm}{dt} = \alpha_m(1 - m) - (\beta_m m) \quad (8)$$

$$m_\infty = \frac{\alpha_m}{\alpha_m + \beta_m} \quad (9)$$

La comparaison expérience-théorie a montré par contre que la variation de m suit une courbe sigmoïde d'exposant X = 3 dans les équations analogues à (6) et (7).

D'autre part, HODGKIN et HUXLEY ont noté expérimentalement une différence très importante entre les courants transmembranaires Na^+ et K^+. En effet, si le courant K^+ se maintient aussi longtemps que l'échelon de potentiel est imposé à la membrane, il n'en est pas de même du courant Na^+. Celui-ci s'affaiblit même si

l'échelon de dépolarisation imposé par le voltage-clamp est maintenu. HODGKIN et HUXLEY ont donc été amenés à considérer un nouveau type de porte qui ne s'ouvre plus en fonction du potentiel comme les précédentes pour permettre le passage des ions mais qui, au contraire se ferme en fonction du potentiel en inactivant progressivement le canal ionique. Ils en ont déduit que la perméabilité aux ions Na^+ est contrôlée par une variable d'activation mais également par une variable d'inactivation sodique (assimilable cette fois à une porte fermant le canal en fonction du potentiel), dénommée h, qui a les propriétés suivantes :

- ✓ contrairement aux variables d'activation n et m, h croît avec le potentiel de membrane, donc α_h décroît avec la dépolarisation,
- ✓ la constante de temps τ_h est environ 10 fois plus grande que τ_m et pratiquement égale à τ_n.

Les différentes équations régissant l'évolution de h sont analogues aux équations (2) à (5) établies pour la variable n. Nous n'expliciterons ici que la dernière égalité :

$$h = h_\infty - (h_\infty - h_0)e^{-t/\tau_h} \qquad (12)$$

Ces phénomènes d'inactivation sont très importants dans la mesure où ils conditionnent la réponse de la cellule à une nouvelle stimulation qui ne pourra être effective que lorsqu'ils seront levés. Leur cinétique est donc l'un des principaux paramètres intervenant dans le définition de la période réfractaire décrite au chapitre suivant.

Dans la mesure où elle dépend de variables d'activation et d'inactivation, la perméabilité aux ions Na^+ de la membrane de l'axone géant est donc proportionnelle au produit $m^3 h$ de telle façon que :

$$g_{Na} = m^3 h \overline{g_{Na}}$$

avec dm/dt et dh/dt variant selon l'équation (8) et l'équation analogue sur h.

Les constantes de vitesse α et β définissant les cinétiques de n, m et h dépendent uniquement du potentiel de membrane. Les valeurs m, n et h peuvent donc prendre toutes les valeurs comprises entre 0 et 1 en fonction du temps et du potentiel.

L'ensemble de ces éléments est qualitativement synthétisé dans la représentation schématique de la figure 7, où le paramètre y est une notation générique représentant les paramètres m, n ou h.

Sur un plan quantitatif, la valeur maximale de n_∞ est atteinte pour une dépolarisation d'environ 60 mV, mais m_∞ atteint seulement cette valeur pour des dépolarisations plus importantes, de l'ordre de 120 mV. Enfin, la valeur de h_∞ est inférieure à 1 au niveau du potentiel de repos, la perméabilité sodique n'étant, dans ces conditions, que partiellement inactivée. La valeur 1 n'est atteinte par h qu'en cas d'hyperpolarisation (environ 50 mV). Le taux d'inactivation peut être exprimé par la différence (1 – h).

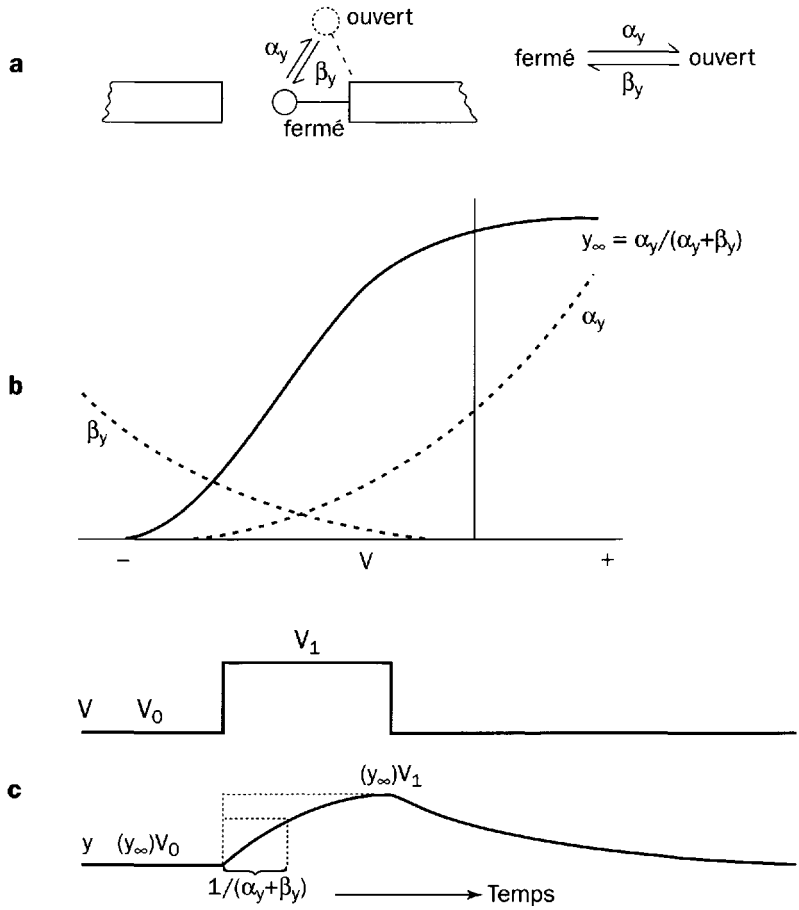


Figure 7 - Diagramme schématique de la théorie d'HODGKIN-HUXLEY représentant les mécanismes de potentiel et dépendance en temps d'un courant ionique à travers un canal
(d'après NOBLE, 1975)

a - les deux états de la porte
b - l'état stationnaire de la courbe d'activation et la variation des coefficients d'ouverture et de fermeture en fonction du potentiel
c - réponse à un échelon carré de potentiel

2.4. EVOLUTION DES CONSTANTES DE TEMPS AVEC LA DÉPOLARISATION

Pendant la phase d'activité (potentiel d'action), les variables m, n et h varient.

✓ La valeur de m croît et décroît presque aussi rapidement que le potentiel de membrane.

✓ La valeur de h décroît plus lentement et n'atteint une valeur nulle qu'une fois la membrane fortement dépolarisée. La valeur initiale de h est progressivement restaurée à la fin du potentiel d'action. Cette période de retour correspond à la période réfractaire qui suit toute excitation.

✓ Enfin, la variation de n est retardée par rapport à la phase initiale du potentiel de membrane. A cause de la valeur de sa constante de temps, n n'atteint jamais une valeur très élevée puisque son accroissement contribue à la re-polarisation de la membrane.

Les variations des conductances g_{Na} et g_K représentatives des perméabilités ioniques au cours du potentiel d'action sont représentées sur la figure 8.

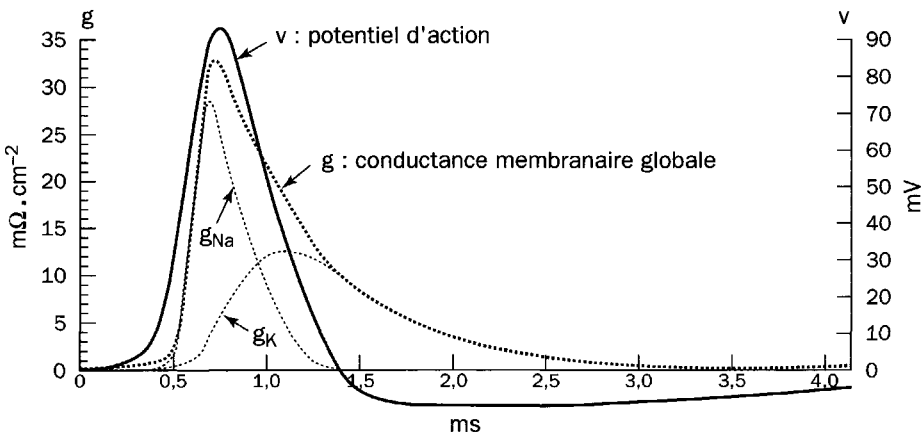


Figure 8 - Variabilité de la conductance membranaire (g) et des composantes g_{Na} et g_K au cours du potentiel d'action (d'après HODGKIN & HUXLEY, 1952)
La forte augmentation initiale de g_{Na} entraîne une entrée massive de sodium dans la cellule provoquant le front raide de dépolarisation. La variation de g_K entraîne une sortie de potassium qui a pour effet de repolariser la cellule qui retrouve son potentiel transmembranaire de repos.

Nous avons précisé dans l'historique introduisant ce chapitre que la théorie ionique de HODGKIN et HUXLEY, initialement développée spécifiquement pour décrire le potentiel d'action de l'axone géant du calmar, a proposé un modèle théorique qui a représenté la base principale du développement de l'électrophysiologie moderne. La figure 9 donne une illustration tout à fait explicite de la validité de ce modèle théorique. La présentation de la méthode de patch-clamp dans le paragraphe suivant nous permettra de montrer que cette théorie reste cohérente avec les mesures plus précises permises par des techniques d'investigation plus fines.

3. *DU VOLTAGE-CLAMP AU PATCH-CLAMP*

La méthode du patch-clamp fut pour la première fois décrite par NEHER et SACKMANN en 1976 [NEHER & SACKMANN, 1976]. Cette découverte leur valut l'attribution du prix NOBEL... en 1991, soit 15 ans après leur découverte (alors qu'HODGKIN et HUXLEY reçurent ce prix l'année de la publication de leur travail de synthèse !).

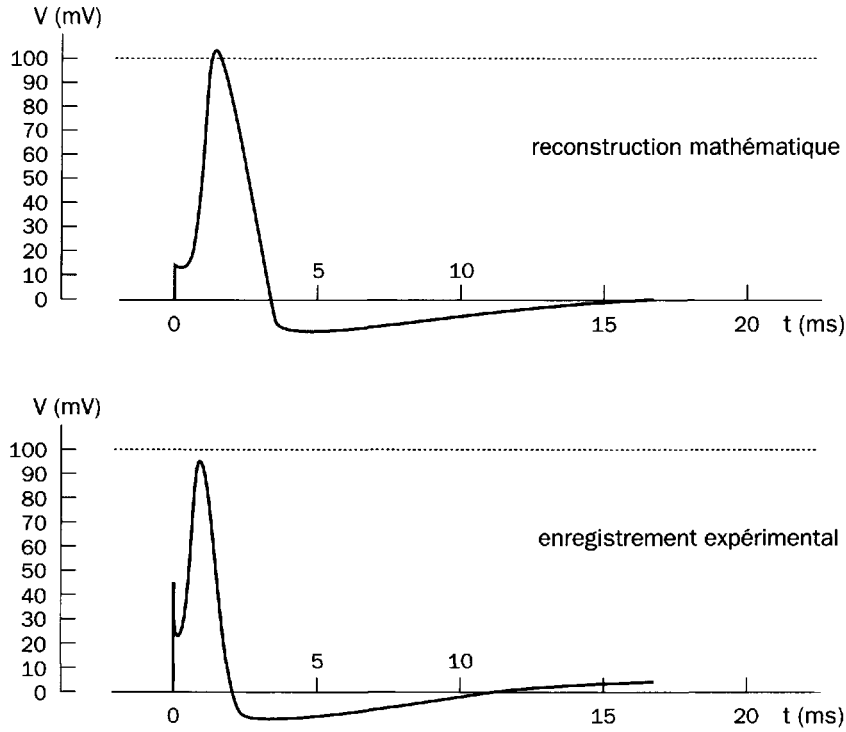


Figure 9 - Courbe supérieure : reconstruction mathématique du potentiel d'action de l'axone géant calculé à partir des équations D'HODGKIN-HUXLEY pour une dépolarisation initiale de 15mV et une température de 18,5°C - Courbe inférieure : enregistrement expérimental du potentiel d'action à partir des mêmes conditions
(d'après HODGKIN & HUXLEY, 1952)

Elle consiste en effet à imposer un échelon de potentiel à un élément de surface aussi réduit que possible (patch) au lieu de l'appliquer à l'ensemble de la membrane comme dans le cas du voltage-clamp.

L'originalité de cette méthode consiste à utiliser une micro-électrode légèrement modifiée au niveau de son extrémité, non plus pour pénétrer à l'intérieur de la cellule, mais pour permettre un contact étroit avec la membrane. On impose alors à cet endroit un échelon de potentiel et on enregistre le courant trans-membranaire résultant (figure 10).

Cette méthode a, pour la première fois, permis l'enregistrement d'un canal unique en configuration dite « cellule attachée ». Il est également possible d'utiliser cette méthode selon différentes configurations, certaines permettant par exemple l'enregistrement de l'ensemble des canaux d'une cellule. Cette configuration dite « cellule entière » (*whole-cell*), permet, par aspiration forte et rupture du patch, l'établissement d'une continuité électrique entre la micropipette et l'intérieur de la cellule.

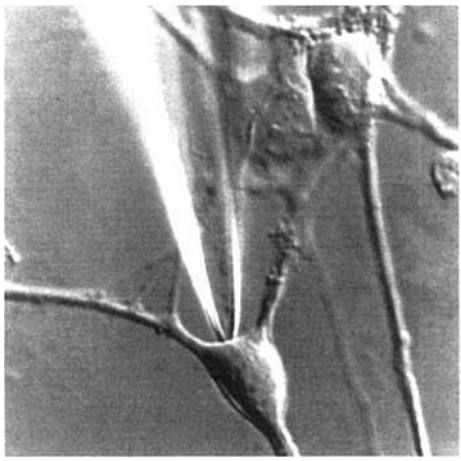


Figure 10 - Microélectrode de patch-clamp (diamètre de pointe inférieur à 1 µm) au contact de la membrane d'une cellule nerveuse
(d'après NEHER & SAKMANN, 1992)

Les configurations patch excisé « *inside-out* » ou « *outside-out* » permettent de jouer très facilement sur la composition ionique des faces externes et internes de la membrane ainsi que d'imposer à volonté le potentiel sur l'une de ces deux faces. Ces différentes configurations sont schématisées sur la figure 11.

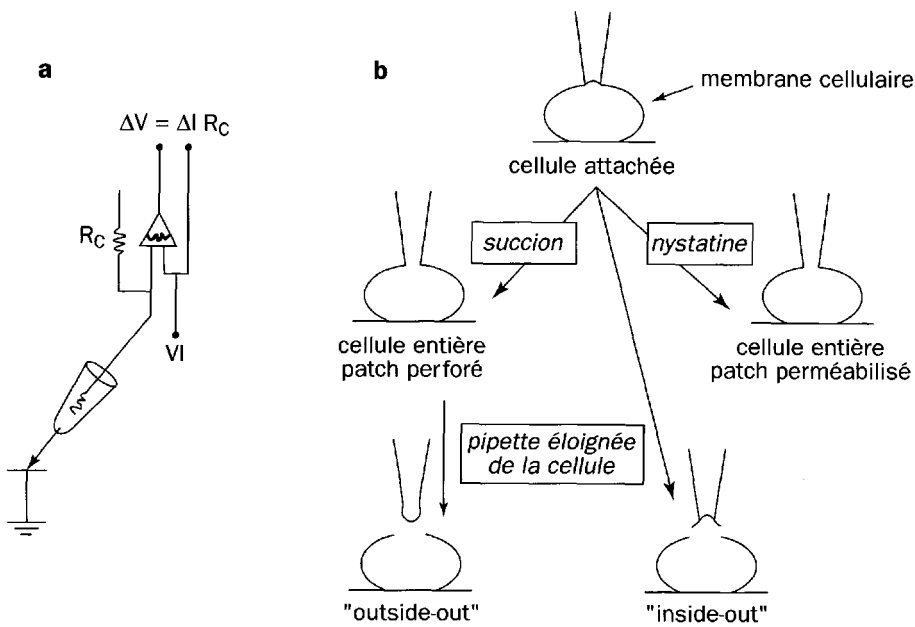


Figure 11 - Différentes configurations utilisées en patch-clamp
(d'après HAMILL *et al.*, 1981)
a - principe d'enregistrement. Tout comme dans le voltage-clamp, un amplificateur à contre réaction est utilisé pour annuler le potentiel imposé Vi et le potentiel du patch membranaire. La différence de potentiel mesurée DV est proportionnelle au courant traversant la membrane.
b - différentes configurations « cellule attachée », « cellule entière » (ou *whole-cell* en anglais) par perforation physique ou perméabilisation de la membrane par un agent chimique dont on veut étudier les effets et les configurations particulières dites « *outside-out* » ou « *inside-out* ».

Lorsqu'on examine les courants élémentaires enregistrés au niveau d'un canal unique, on s'aperçoit qu'il s'agit d'impulsions rectangulaires d'amplitude constante mais de variabilité plus ou moins importante en fréquence et durée (figure 12). Ces courants sont de l'ordre du picoampère en intensité et de la milliseconde en durée, soit une charge de 10^{-15} coulomb représentant environ 10^{4} charges unitaires (10^{-19} coulomb).

Il est certain que l'allure de ces signaux, émis au niveau d'un canal unique, apparaissent assez différents de ceux enregistrés au niveau de la membrane par HODGKIN et HUXLEY. Cependant, si on considère la somme de tous ces signaux, on obtient une courbe moyenne de courant identique à la courbe globale enregistrée au niveau membranaire. Ceci démontre de façon tout à fait remarquable que, si la théorie d'HODGKIN et HUXLEY énoncée il y a maintenant plus d'un demi-siècle ne s'applique pas au comportement du canal ionique élémentaire, elle demeure, par contre, parfaitement représentative du comportement global de l'ensemble des canaux présents au niveau de la membrane cellulaire (figure 12).

a - Courants élémentaires K^+ enregistrés en patch-clamp au cours de dépolarisations imposées successives de – 80 mV à + 20 mV. (O : position ouverte, F : position fermée)

b - Moyenne de 23 traces consécutives représentant, en fait, la variation de probabilité d'ouverture du canal enregistré

c - Courant enregistré sur cellule entière représentant l'activité d'environ 600 canaux montrant la similitude entre cette courbe et celle présentée en **b**

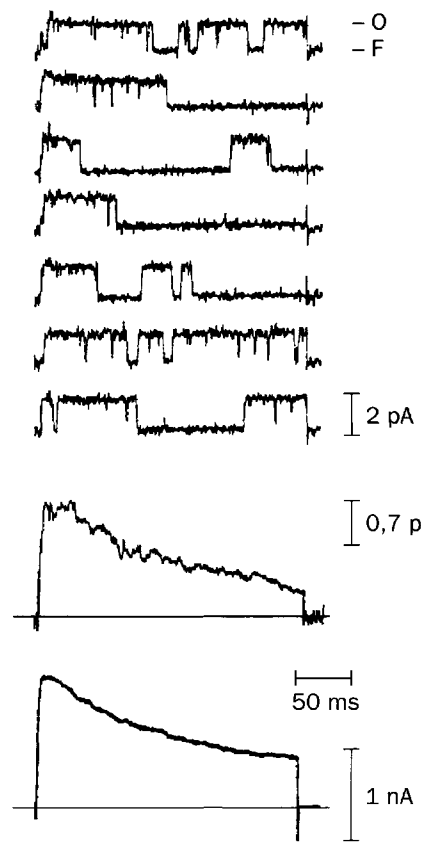


Figure 12 (d'après DUBOIS, 1999, modifié à partir de GANFOMINA, 1991)

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Si le modèle d'HODGKIN-HUXLEY a traversé les âges et demeure la base des modèles les plus récents du potentiel d'action nerveux ou cardiaque, tel celui de LUO et RUDY (1991), d'autres tentatives de modélisation du potentiel d'action des cellules excitables ont été effectuées sur des bases différentes. Parmi ces modèles citons plus particulièrement celui de BONHOEFFER-VAN DER POL basé sur les équations différentielles de VAN DER POL décrivant la relaxation non-linéaire des oscillateurs [VAN DER POL, 1926], généralisées par BONHOEFFER (1948) à la cellule nerveuse sous forme d'une paire d'équations différentielles non linéaires présentant soit un point singulier stable, soit un cycle limite. Ce modèle de BONHOEFFER-VAN DER POL qui a seulement deux variables d'état représentatives de l'excitabilité et de l'inexcitabilité (état réfractaire) de la cellule a été modifié par FITZUGH (1961), dont le modèle couplé à l'équation de NAGUMO a généré le modèle actuellement dénommé modèle de FITZUGH-NAGUMO [7].

Ces modèles ont été utilisés par plusieurs équipes au milieu et vers la fin des années 1990, principalement au niveau de l'étude des phénomènes de propagation (voir chapitre IX), et ont permis d'obtenir des résultats très réalistes. Cependant, les modèles complexes dérivés d'HODGKIN-HUXLEY, tels que le modèle de LUO et RUDY, demeurent encore actuellement très utilisés car ils permettent une étude fine du comportement membranaire au niveau des courants ioniques.

Il est également clair qu'une connaissance plus fine de la structure physique des membranes et de leur propriétés contribuera à améliorer notre compréhension du potentiel d'action et des pathologies liées à ses modifications. Cette démarche ouvre un champ important de recherche dans le domaine du bio-engineering en envisageant la définition et le développement futur de méthodes telles que la microscopie par force atomique, ainsi que des nouvelles méthodes d'imagerie cellulaire ou membranaire susceptibles de fournir une information fine sur cette structure.

Il est également évident qu'une meilleure connaissance de la structure moléculaire des canaux ioniques et des gènes codant pour leur **protéines** constitutives permettrait d'envisager, notamment dans le domaine de la cardiologie, des voies thérapeutiques nouvelles par remodelage de ces canaux [8].

---

7. Pour plus de détails voir :
A.L. BARDOU, P.M. AUGER, P.J. BIRKUI & J.L. CHASSÉ - Modeling of cardiac electophysiological mechanisms : from action potential genesis to its propagation in myocardium. *CRC Critical Reviews in Biomed. Eng.* **24**, 141-221 (1996).
J.P. KEENER - Wave propagation in Myocardium. *In : Theory of the heart.* L. GLASS, P. HUNTER & A. MC CULLOCH eds, Springer-Verlag, New York (1991).

8. A titre d'introduction à la connaissance dans ce domaine se référer à D.J. AIDLEY & P.R. STANFIELD - *Ion Channels, molecules in action.* Cambridge University Press (1996).

Enfin, il semblerait à l'heure actuelle qu'un nouveau champ d'investigation puisse être ouvert à partir de l'étude des phénomènes d'interactions possibles entre les différents canaux, voire de leur comportement de groupe (éventuellement hiérarchique) qui serait susceptible de conférer à ces structures des propriétés potentiellement différentes de celles observées individuellement.

RÉFÉRENCES

C. ADER - Sur un nouvel appareil enregistreur pour câbles sous-marins. *C.R. Acad. Sci. Paris* **124**, 1440 (1897).

W.R. AMBERSON - The influence of fashion in the development of knowledge concerning electricity and magnetism. *Amer. Sci.* **46**, 33 (1958).

G.W. BEELER & R. REUTER - Reconstruction of the Action Potential of Ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* **268**, 177-210 (1977).

J. BERNSTEIN - Die Thermoströme des muskels und die « Membrantheorie » der bioelektrischen ströme. *Pflügers Archiv ges. Physiol.* **131**, 589 (1910).

K.F. BONHOEFFER - Activation of passive iron as a model for the excitation of nerve. *J. Gen. Physiol.* **32**, 69-78 (1948).

E. DU BOIS-REYMOND - *Untersuchungen über thierische Elektricitäts*, vol. I & II. Reimer, Berlin (1848-1860).

M.H. DRAPER & S. WEIDMAN - Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. *J. Physiol. London* **115**, 74 (1951).

J.M. DUBOIS - *Les canaux ioniques cellulaires*. Polytechnica Edts, Economica diffusion, Paris (1999).

W. EINTHOVEN - Uber den Einfluss des Leitungswiderstandes auf die Geschwindigkeit der Quecksilberbewegung in Lippmann's Capillarelectrometer. *Pflügers Arch. ges. Physiol.* **60**, 91 (1895).

W. EINTHOVEN - Un nouveau Galvanomètre. *Arch. Néer. Sci.*, ser. II **6**, 625 (1901).

W. EINTHOVEN - Über die Deutung des Elektrokardiograms. *Pflügers Archivges. Physiol.* **149**, 45-86 (1913).

R. FITZHUG - Impulses and physiological states in theoretical models of nerve membrane. *Biophys. J.* **1**, 445-466 (1961).

L. GALVANI - *De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. De Bononiensi Scientarium et Artium Instituto atque Academia Comentarii* **7**, 363-418 (1791).

L. GALVANI - *Dell'uso e dell'attivita dell'arco conduttore nelle contrazioni dei muscoli*. Tommaso d'Aquino, Bologna (1794).

M.D. GANFOMINA & J. LOPEZ-BARNEO - *Proc. Natl Acad. Sci.* **88**, 2927-2930 (1991).

O.P. HAMILL, A. MARTY, E. NEHER, B. SAKMANN & F.J. SIGWORTH - Improved patch clamp techniques for high- esolution current recording froms cells and cell free membrane patches. *Pflüger Archivs* **391**, 85-100 (1981).

A.L. HODGKIN & P. HOROWICZ - Recording isolated fibre from frog's *Sartorius* muscle. *J. Physiol.* **1369**, 17P (1957).

A.L. HODGKIN, A.F. HUXLEY & B. KATZ - Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch. Sci. Physiol.* **3**, 129-150 (1949).

A.L. HODGKIN & A.F. HUXLEY - Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**, 449-472 (1952a).

A.L. HODGKIN & A.F. HUXLEY - The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **116**, 473-496 (1952b).

A.L. HODGKIN & A.F. HUXLEY - A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544 (1952c).

A.L. HODGKIN & A.F. HUXLEY - The dual effect of membrane potential of sodium conductance in the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **119**, 497-506 (1952d).

B.F. HOFFMAN & P.F. CRANEFIELD - *Electrophysiology of the heart.* Mc Grow Hill Book Co., New York (1960).

G. LING & R.W. GERARD - The normal membrane potential of frog sartorius fibers. *J. Cell. Comp. Physiol.* **34**, 383 (1949).

G. LIPPMANN - Relations entre les phénomènes électriques et capillaires. *Ann. Chim. (Phys.)*, Série 5 **5**, 494 (1875).

C.H. LUO & Y.A. RUDY - Model of the ventricular action potential. Depolarization, repolarization and their interaction. *Circ. Res.* **68**, 1501-1526 (1991).

C. MATTEUCCI - Nouvelles expériences relatives à l'électricité animale. *C.R. Acad. Sci. Paris* **15**, 797 (1842).

E. NEHER, B. SAKMANN - Single channel currents recorded from membrane or denervated frog muscle fibers. *Nature* **260**, 779-802 (1976).

E. NEHER, B. SAKMANN - La technique du patch-clamp. *Pour la Science* **175**, 74-83 (Mai 1992).

D. NOBLE - *The initiation of the heart beat.* Oxford University Press, Oxford (1975).

B. VAN DER POL - On relaxation oscillations. *Phil. Mag.* **2**, 978-989 (1926).

L.A. WOODBURY, H.H. HETCH & A.R. CHRISTOPHERSON - Membrane resting and action potentialsof single cardiac muscle fibersof the frog ventricle. *Amer. J. Physiol.* **164**, 307 (1951).

J.Z. YOUNG - Structure of nerve fibres and synapses in some invertebrates. *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.* **4**, 1 (1936).

Chapitre IX

ELÉMENTS DE PHYSIOLOGIE ET DE PHYSIOPATHOLOGIE CARDIAQUES

ALAIN BARDOU

Le chapitre précédent a abordé la genèse du potentiel d'action au niveau cellulaire. Il est clair que le fonctionnement d'un réseau de cellules excitables, que ce soit au niveau du système nerveux central (chapitre suivant) ou du cœur, repose sur la propagation des potentiels d'action cellulaires au sein de ce réseau. Le but de ce chapitre est de présenter les phénomènes de propagation dans le tissu cardiaque, non seulement dans leur contexte physiologique, mais également à travers certaines pathologies.

1. EXTENSION DE LA THÉORIE D'HODGKIN-HUXLEY À LA CELLULE CARDIAQUE

La validation expérimentale exceptionnelle du modèle théorique d'HODGKIN-HUXLEY sur la cellule nerveuse incita différents chercheurs à tenter une extrapolation de ce modèle à d'autres cellules excitables, notamment aux cellules cardiaques. Cette démarche s'avéra rapidement assez difficile à cause des différences temporelles notables des potentiels d'action nerveux et cardiaques (respectivement 1 et 200 millisecondes) dues à la présence d'autres types de canaux ioniques dans les membranes des cellules cardiaques. Il fallut attendre environ 25 ans pour que les techniques de voltage-clamp appliquées à la fibre cardiaque permettent d'obtenir des résultats suffisamment significatifs pour permettre de générer les premières adaptations correctes de la théorie d'HODGKIN-HUXLEY au tissu cardiaque.

La première de celles-ci a été réalisée par MC ALLISTER, NOBLE et TSIEN en 1975 [MC ALLISTER *et al.*, 1975] sur des fibres du tissu de conduction (**fibres de PURKINJE**, figure 1). La genèse du potentiel d'action cardiaque par les courants sodiques et potassiques y est décrite de la même façon que pour le potentiel d'action nerveux (voir chapitre VIII). La différence principale est l'existence d'un courant rentrant secondaire, à cinétique lente, qui joue un rôle dominant au niveau du plateau du potentiel d'action cardiaque. Les conductances correspondantes sont présentées sur la figure 1.

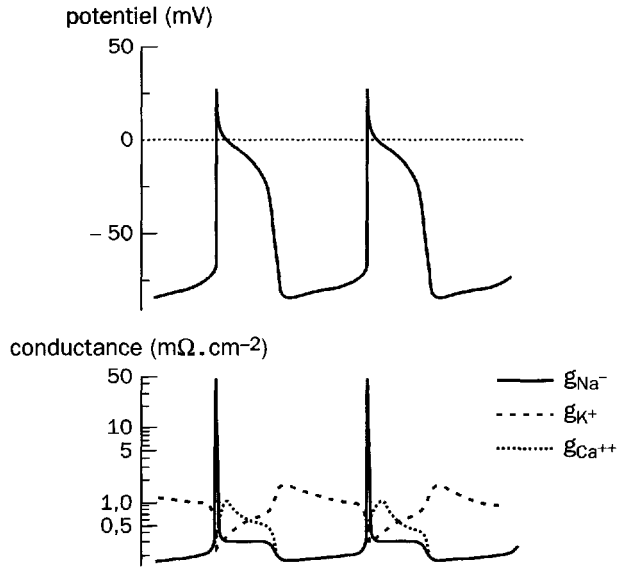


Figure 1 - Variation des conductances au cours du potentiel d'action des fibres du tissu de PURKINJE (d'après NOBLE, 1975)
Les courbes montrent l'importante perméabilité membranaire au calcium impliquée dans le développement du plateau.

Un point très important de la description faite par ces auteurs concerne l'existence d'un courant particulier, le courant pacemaker ou I_{k2}, dû au potassium et qui est responsable de la dépolarisation lente précédent le potentiel d'action dans les tissus automatiques [1] (voir § 2). Ce courant particulier est fondamental dans le fonctionnement du cœur car il est responsable de son activité auto-entretenue (automatisme). C'est en agissant sur ce courant pacemaker que s'effectue la régulation du rythme cardiaque par les systèmes nerveux autonomes **sympathique** ou **parasympathique** (voir § 2).

L'adaptation de la théorie d'HODGKIN-HUXLEY aux fibres myocardiques ventriculaires a été publiée un peu plus tard, en 1977, par BEELER et REUTER. La portée générale et fondamentale de ce travail pour le muscle cardiaque nous conduit à étudier ce modèle en détail, de préférence au modèle précédent de ALLISTER *et al.* qui, bien que d'une conception très élégante, concerne le tissu de conduction, c'est-à-dire un tissu cardiaque beaucoup plus spécialisé.

BEELER et REUTER distinguent dans leur modèle quatre composantes dans le courant transmembranaire ionique global :

1. On désigne par tissus automatiques les tissus cardiaques susceptibles de générer spontanément une dépolarisation. Le seul tissu présentant cette propriété dans les conditions physiologiques est le nœud sinusal dont les dépolarisations spontanées entraînent en se propageant la contraction cardiaque (voir § 2 et figure 5). Cependant les fibres de PURKINJE ou les cellules du nœud auriculo-ventriculaire peuvent également présenter cette propriété dans certaines conditions pathologiques.

1. un courant rentrant sodique i_{Na}, dépendant du potentiel et du temps, qu'ils appellent le courant rentrant sodique excitateur (excitatory inward Na^+ current),
2. un deuxième courant entrant i_s (slow), se développant plus lentement, principalement provoqué par une entrée d'ions Ca^{++}. Ce courant joue un rôle prépondérant dans le développement du plateau du potentiel d'action myocardique et il est responsable du couplage entre l'excitation de la fibre cardiaque (par son potentiel d'action) et sa contraction,
3. un courant potassique sortant i_{k1}, indépendant du temps,
4. un courant potassique sortant i_{x1}, dépendant du potentiel et du temps.

Le courant i_s est responsable de la phase rapide de dépolarisation du potentiel d'action, les autres courants déterminant la configuration du plateau et la repolarisation.

Pour modéliser le courant rentrant sodique i_{Na}, BEELER et REUTER, mais aussi MC ALLISTER *et al*, ont conservé le paramètre d'activation sodique m, déterminé pour l'axone géant par HODGKIN et HUXLEY (voir chapitre VIII, § 2.3). D'autre part, les expériences ont montré que la réactivation de i_{Na} avait une constante de temps plus lente que son inactivation. Comme il était impossible de simuler cette propriété en décrivant l'inactivation avec un paramètre unique, BEELER et REUTER ont introduit un deuxième paramètre d'inactivation, le paramètre j. Ce paramètre traduit une dépendance vis-à-vis du potentiel similaire à celle de la variable d'inactivation h (voir chapitre VIII, § 2.3), mais avec une constante de temps τ_j différente. Dans ces conditions, l'expression du courant sodique i_{Na} est donné par la relation [2] :

$$i_{Na} = \left(\overline{g_{Na}} . m^3 . h . j + g_{NaC}\right)\left(V_m - E_{Na}\right) \qquad (1)$$

La caractérisation du courant entrant lent i_s a, selon les termes exacts de BEELER et REUTER, reçu plus d'attention au niveau expérimental que toute autre composante du courant ionique. En effet, une longue controverse s'est développée chez les électrophysiologistes sur le rôle respectif des ions Na^+ et Ca^{++} dans l'établissement de ce courant. Les évidences expérimentales [REUTER, 1973 ; REUTER & SCHOLZ, 1976] ont conduit BEELER et REUTER à considérer que le calcium était majoritairement impliqué dans ce courant. Ils l'ont alors modélisé comme un courant rentrant transitoire, contrôlé par de simples paramètres d'activation et d'inactivation d et f, et dont la valeur est donnée par l'expression :

$$i_s = \overline{g_s} . d . f . \left(V_m - E_s\right) \qquad (2)$$

Nous avons mentionné plus haut le rôle fondamental de ce courant, responsable à la fois du retard à la repolarisation et du couplage excitation-contraction de la fibre cardiaque. En effet, le potentiel d'action d'une fibre cardiaque est suivi d'une contraction qui représente de fait sa fonction princeps (figure 2). Le calcium

2. Dans les équations qui suivent, les différentes variables g correspondent aux conductances ioniques membranaires de chaque ion considéré, telles qu'elles ont été définies dans le chapitre VIII.

entrant dans la cellule pendant le potentiel d'action se comporte alors comme un déclencheur (*trigger*) qui induit un relargage important de calcium par le **réticulum sarcoplasmique**, selon un processus autocatalytique bien documenté [3] de calcium induced - calcium release (ou ***CICR*** en anglais). Cette libération de calcium agit comme un stimulus au niveau des **protéines** contractiles cardiaques en engendrant leur contraction [4].

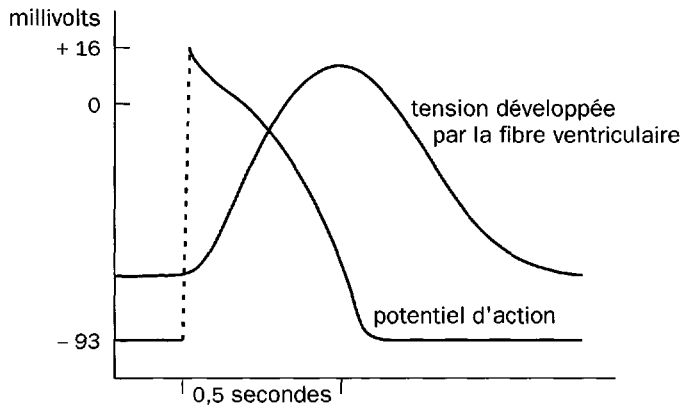


Figure 2 - Relations entre le potentiel d'action et la tension mécanique d'une fibre ventriculaire montrant l'initialisation de l'activité contractile pendant le plateau du potentiel d'action (d'après KAVALER *et al.*, 1965)

Nous avons mentionné précédemment l'existence de plusieurs courants sortant potassiques. Alors que les travaux expérimentaux de MC ALLISTER *et al.* sur les fibres de PURKINJE (tissu de conduction) indiquaient l'existence possible de quatre courants potassiques, BEELER et REUTER ont constaté que seulement deux courants potassiques (i_{x1} et i_{k1}, précédemment cités) suffisaient à rendre compte parfaitement du potentiel d'action au niveau du myocarde ventriculaire. En effet, ce tissu myocardique ne présente pas de dépolarisations spontanées dans les conditions normales, contrairement aux fibres de PURKINJE qui peuvent recouvrer une activité automatique spontanée lorsqu'elles sont isolées.

---

3. Pour plus de détails sur le CICR voir :
   - au plan de la physiologie :
     W.G. WIER & C.W. BALKE - Ca^{++} release mechanisms, Ca^{++} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ. Res.* **85**, 770-776 (1999).
     D.M. BERS - Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205 (2002).
   - au plan des modèles théoriques :
     G. DUPONT, J. PONTES & A. GOLDBETER - Modeling spiral Ca^{++} waves in single cardiac cells: role of the spatial heterogeneity created by the nucleus. *Am. J. Physiol.* **271**, C1390-1399L (1996).
     G. DUPONT & A. GOLDBETER - Properties of intracellular Ca^{++} waves generated by a modelbased on Ca^{++}-induced Ca^{++} release. *Biophys. J.* **67**, 2191-2204 (1994).
     G. DUPONT & A. GOLDBETER - One-pool model for Ca^{++} oscillations involving Ca^{++} and inositol 1,4,5-trisphosphate as co-agonists for Ca^{++} release. *Cell Calcium* **14**, 311-322 (1993).
4. Sur la contraction musculaire et le rôle joué par le calcium, voir L. HOPIE - *The Heart. Physiology from cell to circulation*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New York (1998).

BEELER et REUTER ont modélisé ces deux courants potassiques, i_{x1} et i_{k1}, par les expressions :

$$i_{k1} = 0,35\left[4\frac{e^{0,04(V_m+85)}-1}{e^{0,08(V_m+53)}+e^{0,04(V_m+53)}}+0,2\frac{(V_m+23)}{1-e^{-0,04(V_m+23)}}\right] \quad (3)$$

$$\overline{i_{x1}} = i_{x1} \cdot x_1 \quad (4)$$

où

$$\overline{i_{x1}} = 0,8\frac{e^{0,04(V_m+77)}-1}{e^{0,04(V_m+35)}} \quad (5)$$

La figure 3 met parfaitement en évidence l'excellente corrélation existant entre les potentiels d'action enregistrés expérimentalement et ceux calculés à partir de ce modèle.

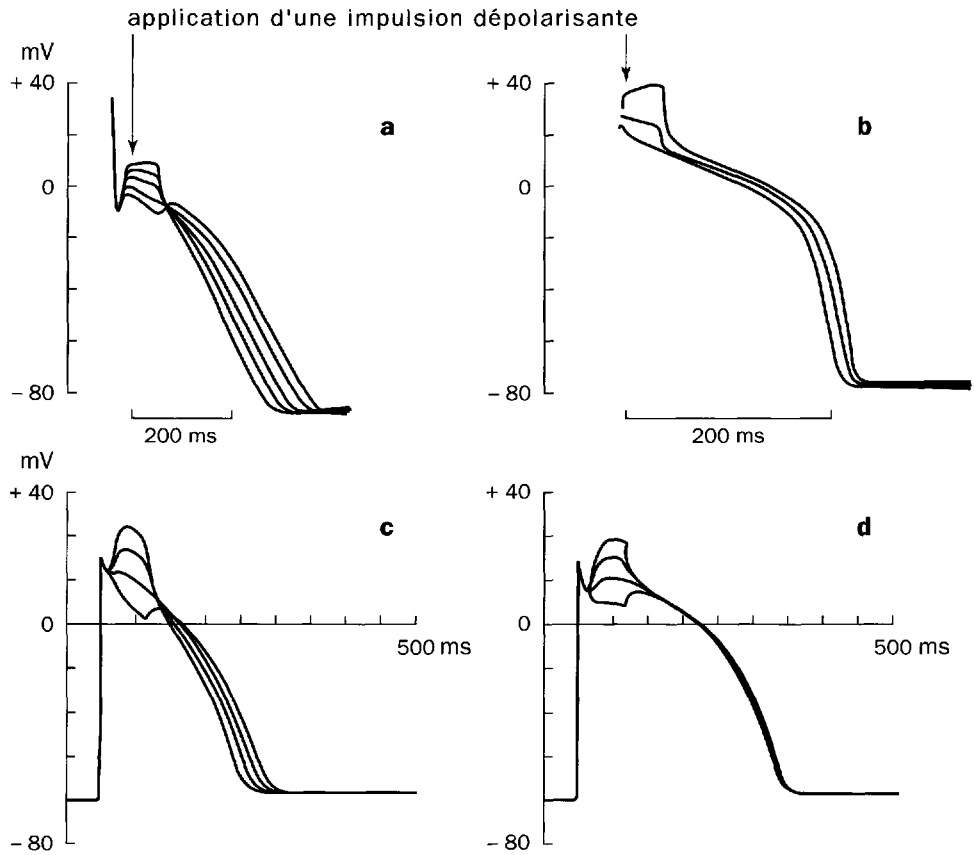


Figure 3 (d'après BEELER & REUTER, 1977)
a et **b** - résultats obtenus expérimentalement sur le raccourcissement de la durée du potentiel d'action par application d'une impulsion dépolarisante au début du plateau
c et **d** - reconstructions mathématiques correspondantes en utilisant le modèle de BEELER et REUTER

Les différents modèles que nous avons mentionnés ont été construits à partir d'informations expérimentales obtenues grâce à la méthode du voltage-clamp.

Nous avons vu au chapitre VIII (§ 2.2) que cette méthode, mise au point par HODGKIN et HUXLEY dans le but de recueillir les informations nécessaires au développement de leur théorie, consiste à imposer un échelon de potentiel au niveau membranaire afin d'étudier le comportement de celle-ci dans ces conditions imposées (application de courants transmembranaires, modification des conductances ioniques). Il paraît important de rappeler qu'à l'heure actuelle, même si cette méthode peut toujours être utilisée, la méthode du patch-clamp (chapitre VIII, § 2.5) représente de plus en plus l'outil princeps de l'électrophysiologiste en permettant un changement d'échelle qui permet de passer du niveau de la membrane excitable à celui du canal ionique.

2. *GENÈSE ET PROPAGATION DE L'EXCITATION DANS LE CŒUR*

Le caractère rythmique et auto-entretenu (automaticité) des contractions du cœur est une propriété intrinsèque de cet organe, qui continue à battre même totalement extrait de la cage thoracique. Ce phénomène était déjà connu au temps des Aztèques : ceux-ci estimaient l'acceptation des sacrifices humains par leurs divinités en fonction du temps pendant lequel le cœur, arraché de la poitrine des sacrifiés, continuait à battre. Si la circulation coronaire[5] est assurée par une perfusion artificielle, le cœur isolé est susceptible de conserver son activité rythmique pendant une période de plusieurs heures.

Le site de cet automatisme réside dans un tissu très particulier, le nœud sinusal, également dénommé nœud sino-atrial ou nœud de KEITH et FLACK, du nom des auteurs qui le mirent pour la première fois en évidence en 1906. Ce nœud sinusal est la rémanence phylogénétique du sinus veineux des cœurs de vertébrés inférieurs. C'est une petite structure (25 mm × 5 mm) située dans l'oreillette droite, quasiment à la jonction de la veine cave supérieure (voir figure 5).

Les potentiels d'action émis par cette structure sont très particuliers (voir chapitre VIII, figure 5) :

- ✓ le potentiel de repos de ces cellules nodales est très inférieur à celui des cellules myocardiques (– 60 mV au lieu de – 90 mV),
- ✓ la pente dV/dt de la phase initiale de dépolarisation est beaucoup plus faible,
- ✓ le plateau est absent,
- ✓ la repolarisation du tissu est beaucoup plus graduelle.

Cependant, la propriété principale des potentiels d'action de ces **cellules pacemaker** réside dans l'instabilité du potentiel de repos : dès que celui-ci est atteint, ces cellules présentent une pente de dépolarisation lente jusqu'à une valeur

5. Lectures de base sur la circulation : H.A. FOZZARD, E. HABER, R.B. JENNINGS, A.M. KATZ & H.E. MORGAN - The Heart and cardiovascular system. Raven Press, New York (1986).
J. SHEPERD & P. VANHOUTTE - *The human cardiovascular system. Facts and concepts.* Raven Press, New York (1980).

seuil où le potentiel d'action se déclenche. Cette phase de dépolarisation lente est la signature absolue des tissus automatiques (elle apparaît par exemple chez les cellules du **tissu de PURKINJE** isolé au moment où celles-ci recouvrent une fonction automatique). Cette pente de dépolarisation lente est due à l'existence spécifique, chez les cellules pacemaker, d'une fuite potassique constante dès qu'elles sont revenues à leur potentiel de repos. Cette fuite potassique entraîne une dépolarisation membranaire en modifiant les concentrations intra- et extra-cellulaires de potassium. Cette dépolarisation membranaire se poursuit jusqu'à une valeur seuil pour laquelle le potentiel d'action est déclenché.

La fréquence de polarisation de ces cellules pacemaker est contrôlée par le système nerveux autonome (figure 4).

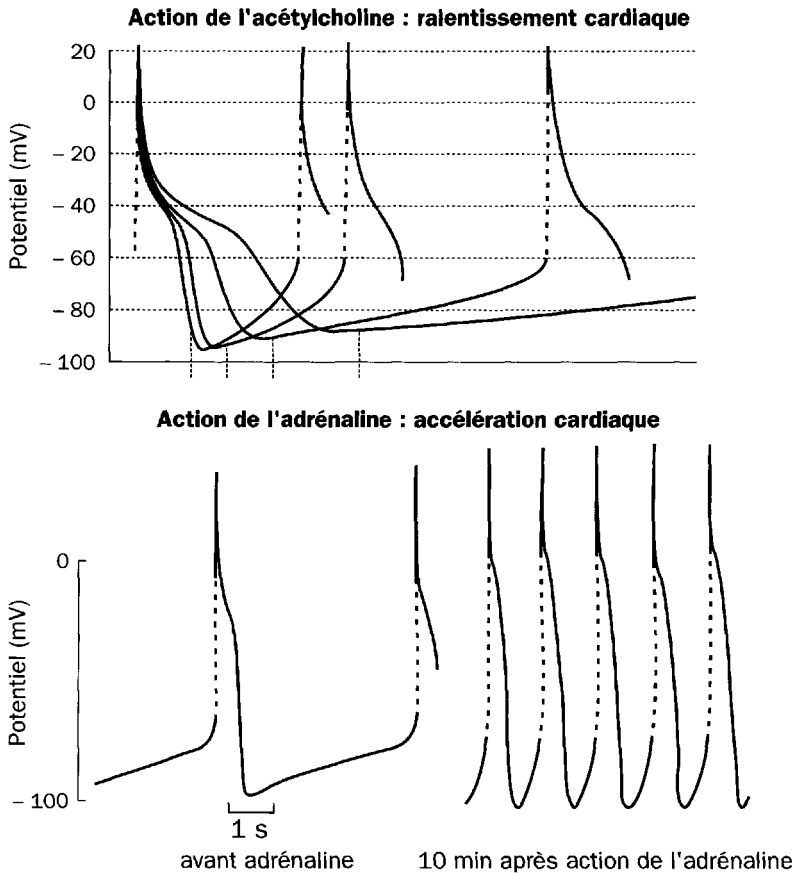


Figure 4 - Régulation de la fréquence cardiaque par les système nerveux sympathique ou parasympathique (d'après NOBLE, 1975)

a - le système parasympathique (le neurotransmetteur est l'acétylcholine) agit en réduisant la pente de dépolarisation. Le seuil d'activation est atteint plus tard, entraînant un ralentissement de la fréquence cardiaque.

b - le système sympathique (le neurotransmetteur est l'adrénaline) agit en augmentant la pente de dépolarisation lente. Le seuil d'activation est atteint plus précocement entraînant une accélération de la fréquence cardiaque.

Ce système nerveux autonome intervient dans les régulations des grandes fonctions physiologiques dont la fonction cardiaque. Il se compose des systèmes sympathique et parasympathique qui agissent par l'intermédiaire de médiateurs chimiques, respectivement l'adrénaline et l'acétyl-choline. Un tonus vagal[6] élevé (système parasympathique) correspond à une sécrétion accrue d'**acétylcholine** (voir chapitre X, § 3.1). Cette substance a pour effet de réduire la fuite potassique membranaire des tissus automatiques. La pente de dépolarisation lente est réduite et le seuil de déclenchement du potentiel d'action est atteint plus tardivement. La fréquence cardiaque est diminuée. A l'inverse, un tonus sympathique accru correspond à une augmentation de la sécrétion d'**adrénaline** (situations de stress, d'effort...) qui élève la fréquence cardiaque en augmentant la pente de dépolarisation lente (le seuil de déclenchement est atteint plus rapidement). Ces actions antagonistes sur la fréquence cardiaque sont représentées sur la figure 4.

Les potentiels d'action délivrés par le nœud sinusal se propagent à la musculature auriculaire adjacente puis sont transmis à l'échelon ventriculaire par une structure spécifique intrinsèque au cœur dénommée tissu de conduction ou tissu nodal, représenté sur la figure 5 et dont les propriétés ont été décrites au paragraphe 1 [REUTER & SCHOLZ, 1976]. Ces potentiels d'action sont ensuite transmis à l'ensemble du myocarde, entraînant la contraction cardiaque.

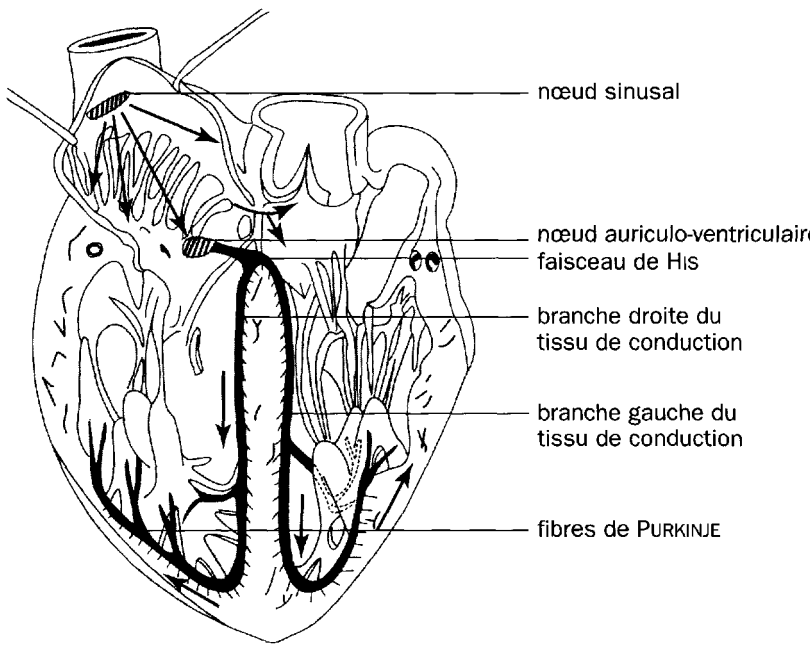


Figure 5 - Représentation schématique du tissu de conduction cardiaque composé du nœud sinusal, du nœud auriculo-ventriculaire, du faisceau de His et des fibres de PURKINJE

6. Le terme *vagal* vient de la dénomination de nerf vague correspondant à l'ancien nom du principal nerf efférent du système parasympathique, actuellement nommé nerf pneumogastrique (ou nerf X dans la numérotation conventionnelle des nerfs crâniens).

Dans la musculature auriculaire, l'activation associée aux potentiels d'action se propage à une vitesse d'environ 1 m/s en suivant les fibres musculaires avant d'atteindre le nœud auriculo-ventriculaire (figure 5).

Ce nœud auriculo-ventriculaire est prolongé par le faisceau de HIS, qui longe le côté droit du septum interventriculaire sur environ 12 mm avant de se séparer en deux branches droite et gauche (figure 5). Chaque branche se subdivise alors en un réseau complexe de fibres conductrices, les **fibres de PURKINJE** (ou réseau de PURKINJE), du nom de Jean-Evangéliste PURKINJE qui les découvrit en 1839 à partir de leur coloration particulière en présence de lugol.

Ces fibres de PURKINJE se ramifient sur la surface endocardique [7] des deux ventricules. Leurs potentiels d'action sont du même type que ceux des fibres myocardiques ventriculaires, si ce n'est que leur durée est un peu plus longue et qu'elles sont capables de recouvrer des propriétés automatiques lorsqu'elles sont isolées. Par contre, c'est au niveau des fibres de PURKINJE que la vitesse de propagation des potentiels d'action dans le tissu cardiaque est maximale, pouvant atteindre 4 m/s. Cette caractéristique permet d'obtenir une activation très rapide de l'ensemble de la surface endocardique des deux ventricules. Les fibres de PURKINJE n'étant réparties qu'à la surface de l'endocarde, l'activation transmurale des ventricules (de l'endocarde vers l'épicarde [8]) s'effectue le long des fibres musculaires ventriculaires à une vitesse dix fois plus faible, de 0,3 à 0,5 m/s. Le schéma de principe de l'activation cardiaque est représenté sur la figure 6.

Le nœud auriculo-ventriculaire est un élément particulièrement important de la conduction cardiaque. En effet, les oreillettes et les ventricules sont parfaitement isolés et le nœud auriculo-ventriculaire et le faisceau de HIS représentent les seules voies possibles permettant aux potentiels d'action d'accéder de l'échelon auriculaire à l'échelon ventriculaire (les dysfonctionnements de ce système de conduction atrio-ventriculaire, correspondant aux pathologies de bloc auriculo-ventriculaire, seront précisées dans le paragraphe suivant).

Un autre rôle très important joué par ce nœud auriculo-ventriculaire est d'introduire un délai dans la transmission de l'activation entre le niveau auriculaire et le niveau ventriculaire (voir figure 8). Ce délai, compris entre 120 et 200 ms chez le sujet sain, permet un remplissage ventriculaire optimal pendant la contraction des oreillettes. Ce délai est dû à la très petite taille des fibres de jonction qui limitent la vitesse de conduction à environ 0,05 m/s.

---

7. La surface endocardique correspond à la partie du muscle cardiaque (myocarde) composant l'intérieur de la paroi ventriculaire ou endocarde.

8. Par opposition à l'endocarde, l'épicarde correspond au tissu composant la surface externe de la paroi ventriculaire.

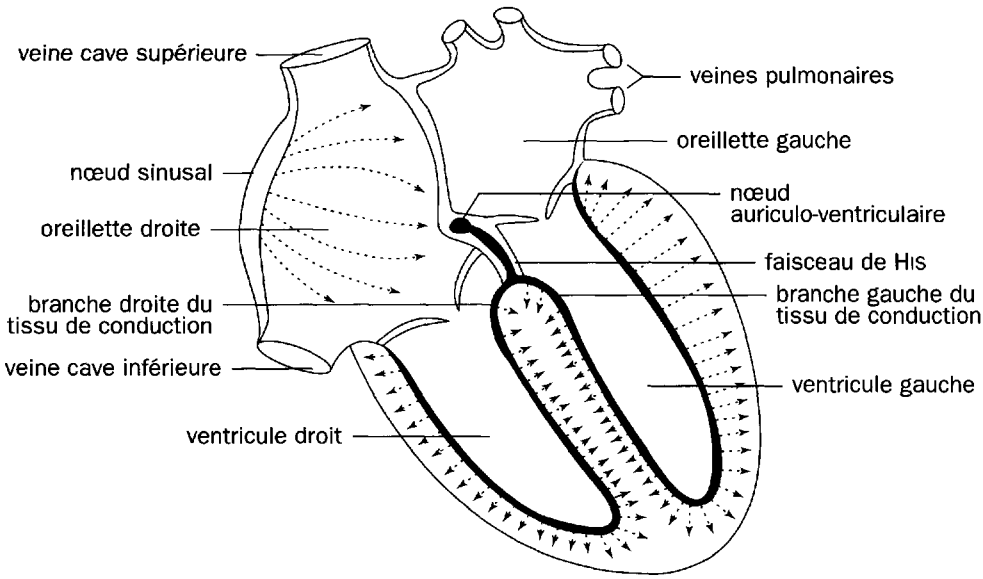


Figure 6 - Représentation schématique de l'activation cardiaque (cœur vu de face)
Le potentiel d'action se propage de l'oreillette à la paroi interne des ventricules (endocarde) par le tissu de conduction. L'activation cardiaque se propage alors de l'endocarde, stimulé par le réseau de PURKINJE, à l'épicarde, directement par le myocarde ventriculaire. Cette notion est importante car c'est au cours de cette propagation interventriculaire que se développent les mécanismes susceptibles d'induire la fibrillation ventriculaire responsable de la majorité des cas de mort subite par arrêt cardiaque (voir § 3 du présent chapitre sur les arythmies).

3. DE LA PROPAGATION DES POTENTIELS D'ACTION À L'ELECTROCARDIOGRAMME PRÉSENTATION DE QUELQUES ARYTHMIES CARDIAQUES

L'électrocardiogramme (ECG) fournit un signal temporel qui correspond à la résultante de toutes les activités cellulaires électriques impliquées dans un battement cardiaque. Si les activités cellulaires sont de l'ordre de 100 mV, le signal ECG n'est que de l'ordre de quelques millivolts pour le complexe QRS (voir chapitre VIII, § 1) qui en est la partie de plus grande amplitude.

La chronologie des différentes ondes apparaît clairement sur la figure 7. On constate que l'onde P de l'ECG est associée à l'activité auriculaire, tandis que les ondes QRS et T correspondent respectivement aux phases de dépolarisation et de repolarisation de la masse ventriculaire. La corrélation entre l'intervalle P-Q et le retard à la conduction introduit par le nœud auriculo-ventriculaire est également parfaitement visible sur cette figure.

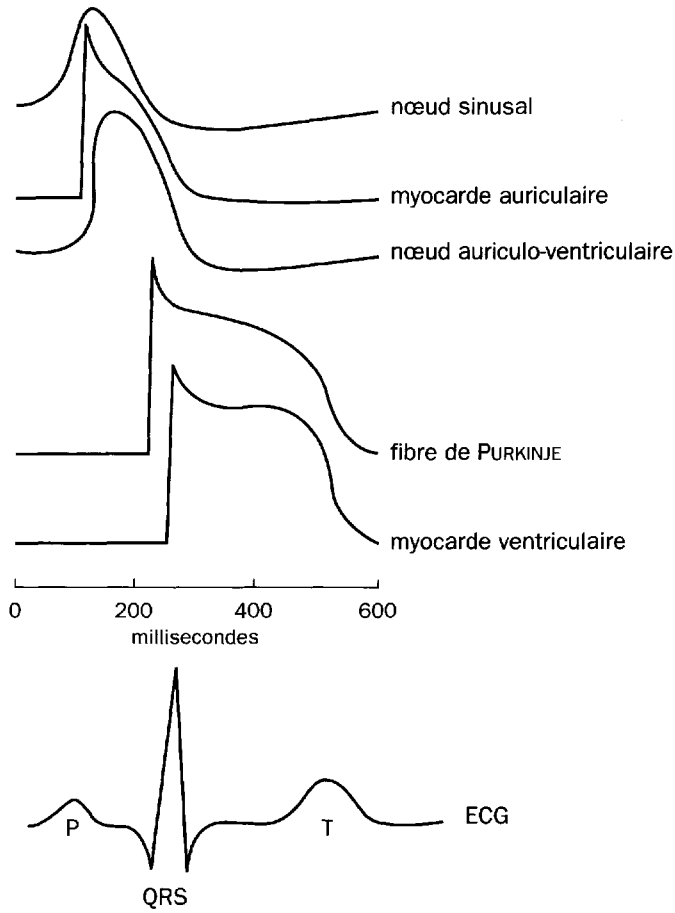


Figure 7 - Enregistrement simultané de cinq potentiels d'action cellulaires au niveau de différents tissus cardiaques et profil d'un électrocardiogramme

Les abréviations désignent respectivement : SAN : nœud sinusal, AM : myocarde auriculaire, AVN : nœud auriculo-ventriculaire, PF : fibres de PURKINJE, VM : myocarde ventriculaire.
On remarquera :
- la simultanéité de l'onde P et des phases de dépolarisation des potentiels d'action auriculaires (la repolarisation auriculaire étant noyée dans le QRS),
- la simultanéité du complexe QRS et des phases de dépolarisation des potentiels d'action ventriculaires, ainsi que celle de l'onde T avec les phases de polarisation ventriculaires.

L'espace P-Q correspond au délai introduit par le nœud auriculo-ventriculaire (voir figure 8).

Différentes perturbations dans la conduction des potentiels d'action au sein du tissu cardiaque peuvent conduire à différentes arythmies observables sur l'ECG, constituant ainsi un champ d'étude privilégié reliant traitement du signal et analyse et/ou prévision des pathologies. Nous prolongerons les paragraphes précédents en présentant brièvement en dernière partie de ce chapitre quelques situations pathologiques associées à des modifications caractéristiques de la « signature temporelle » fournit par l'ECG.

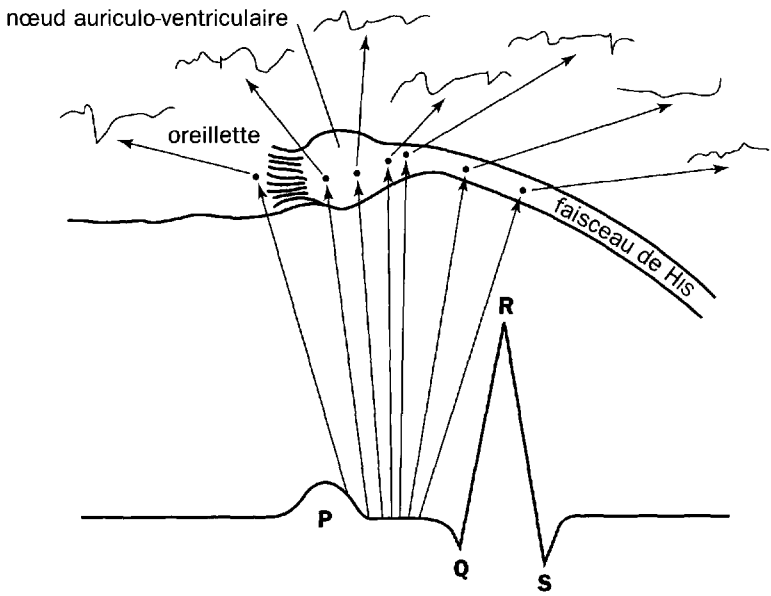


Figure 8 - Enregistrements de potentiels extracellulaires selon sept sites proches de la région du nœud auriculo-ventriculaire et du faisceau de His
Cet enregistrement montre bien le fait qu'une large part de l'intervalle entre la fin de l'onde P et le début du complexe QRS correspond au passage de l'activation entre les niveaux auriculaire et ventriculaire (d'après SCHER *et al.*, 1959).

3.1. ARYTHMIES SINUSALES

Les arythmies sinusales correspondent à une variabilité de la fréquence des décharges du nœud sinusal, généralement due à des perturbations du contrôle de ce nœud par les systèmes nerveux autonomes (action sur la pente de dépolarisation lente précédemment décrite). La figure 9 présente des exemples d'ECG correspondant à une tachycardie (accélération) et à une bradycardie (ralentissement) d'origine sinusale. On notera que les déflections P, QRS et T sont parfaitement normales. L'activation cardiaque s'effectue selon le schéma physiologique décrit précédemment. La fréquence de cette activation est simplement ralentie ou accélérée. Seule la durée du cycle cardiaque est modifiée.

3.2. BLOCS AFFECTANT LA CONDUCTION AURICULO-VENTRICULAIRE

Le nœud auriculo-ventriculaire étant la seule voie possible pour la propagation de l'activation des oreillettes aux ventricules, les troubles affectant ce tissu vont avoir des répercussions sur l'activation et donc sur la contraction ventriculaire. Ces troubles du rythme sont communément appelés « blocs auriculo-ventriculaires » et peuvent revêtir différents niveaux de gravité.

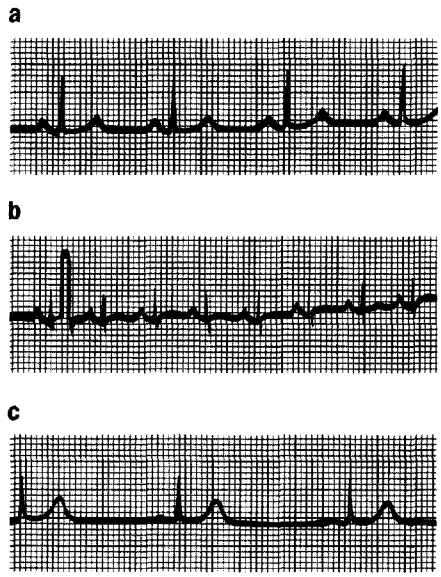


Figure 9 - Différents rythmes sinusaux (d'après BERNE & LEVY, 1967, droits réservés)
a - rythme sinusal ; **b** - tachycardie sinusale ; **c** - bradycardie sinusale

On en distingue classiquement trois.

✓ Les blocs dits du premier degré sont caractérisés par une diminution de la vitesse de propagation dans le nœud auriculo-ventriculaire. Toutes les ondes P sont suivies d'un complexe QRS. Toutes les activations sont transmises au ventricule mais l'intervalle P-R s'est allongé. Un exemple de bloc auriculo-ventriculaire du premier degré est montré sur la figure 10. L'intervalle P-R est de 0,28 s alors qu'il est considéré comme pathologique à partir de 0,20 s.

✓ Dans les blocs auriculo-ventriculaires du second degré, la perte de conduction est devenue telle que toutes les activations auriculaires ne peuvent plus être transmises aux ventricules. Cette transmission est généralement d'1 sur 2, mais peut être de 1 sur 3 ou de 2 sur 3... Un exemple typique de bloc 1 sur 2 est présenté sur la figure 10. Une onde P est transmise et suivie d'un complexe QRS, alors que l'onde P suivante est parfaitement isolée, c'est-à-dire non suivie d'un complexe QRS : elle n'engendre donc aucune contraction ventriculaire.

✓ Dans les blocs auriculo-ventriculaires du troisième degré, généralement rangés sous le vocable de blocs auriculo-ventriculaires complets, le nœud ne conduit plus et l'activation auriculaire ne parvient jamais au niveau ventriculaire. Théoriquement, ce type de bloc devrait être immédiatement létal puisque seules des contractions auriculaires peuvent dans ces conditions être générées. En fait, comme nous l'avons vu précédemment, certaines cellules cardiaques du système de conduction peuvent dans ces conditions particulières recouvrer des propriétés d'automatisme, créant ainsi des pacemakers dits ectopiques susceptibles de générer une contraction ventriculaire totalement indépendante de celle des oreillettes (rythme dit idioventriculaire).

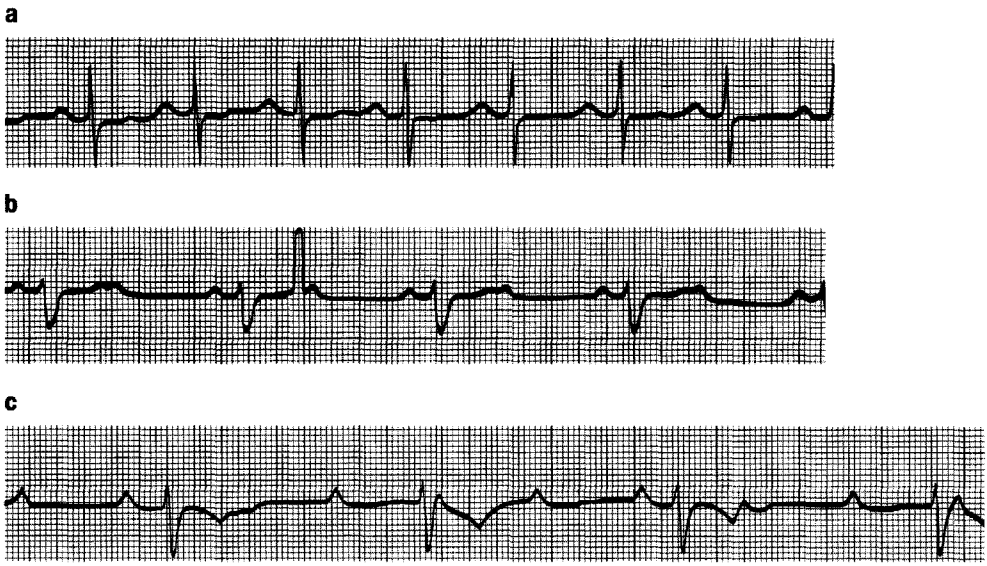


Figure 10 - Blocs auriculo-ventriculaires (d'après BERNE & LEVY, 1967, droits réservés)
a - bloc A-V du 1er degré (intervalle PR 0.28 sec.) ; **b** - bloc A-V du 2e degré (1 sur 2)
c - bloc A-V avec dissociation totale entre les ondes P et les complexes QRS

Ce rythme idioventriculaire est généralement très lent (fréquence de 32 min^{-1} dans l'exemple de la figure 10). Il est très instable et peut cesser de façon totalement subite et imprévisible, débouchant sur la syncope dite d'ADAMS-STOKES. Celle-ci, généralement mortelle, correspond à un rythme suffisamment lent (quelques battements par minute) pour être assimilable à un arrêt cardiaque. Ce type de syndrome est à l'heure actuelle quasi totalement éradiqué par la pose préventive de stimulateurs cardiaques implantables (*pacemakers*).

Ce phénomène de bloc, décrit ici au niveau de la conduction auriculo-ventriculaire, peut affecter d'autres parties du tissu de conduction et plus particulièrement les branches droites ou gauches du faisceau de HIS. On parlera alors de blocs de branche (droit ou gauche), dont les conséquences sont beaucoup moins graves que les blocs auriculo-ventriculaires dans la mesure où la conduction n'est dans ce cas affectée qu'après transmission au myocarde ventriculaire qui est de toute façon activé, même si cette activation est imparfaite.

Les mécanismes cellulaires à l'origine de ces blocs au niveau des tissus de conduction correspondent à l'apparition d'une propagation discontinue conduisant à un ralentissement global de la propagation au sein de ces structures. Des études en microélectrodes ont permis de montrer que l'on observe en fait une diminution de l'amplitude des potentiels d'action ainsi que du dV/dt de leur phase ascendante, paramètres directement reliés à l'aptitude de se propager pour ces potentiels d'action et à leur vitesse de propagation [JALIFE *et al.*, 1999]. Il a également été possible de montrer un allongement du potentiel d'action ainsi qu'un retard à la récupération de l'excitabilité cellulaire, facteurs dus à une désactivation lente du courant repolarisant i_K apparaissant dans ce type de pathologies et allant dans le

sens d'une prolongation importante de la période réfractaire. Des travaux récents effectués sur myocytes isolés tendraient à montrer qu'un comportement non-linéaire observé au niveau de ces cellules pourrait également être impliqué dans le développement de ces pathologies [JALIFE *et al.*, 1999].

3.3. TACHYCARDIES D'ORIGINE ECTOPIQUE

Ces tachycardies sont provoquées par l'apparition d'un **foyer ectopique** au sein du tissu cardiaque, provoquant une contraction surnuméraire de ce dernier qualifiée d'extra-systole. Elles démarrent aussi brusquement qu'elle s'arrêtent et sont couramment rangées dans les troubles dits « paroxystiques » [9].

Les tachycardies paroxystiques ayant pour origine l'oreillette ou le nœud auriculo-ventriculaire sont difficiles à distinguer et sont rangées dans les tachycardies paroxystiques dites « supraventriculaires ». Un électrocardiogramme illustrant ce type d'arythmie est représenté sur la figure 11. Les complexes QRS sont normaux dans la mesure où l'activation ventriculaire se fait par les voies de conduction physiologiques. Il faut noter que lorsque la fréquence supraventriculaire devient trop élevée, le nœud auriculo-ventriculaire devient incapable de conduire toutes les activations d'origine auriculaire. Un bloc du deuxième degré est dans ce cas observé de façon simultanée.

L'électrocardiogramme associé à une tachycardie ventriculaire paroxystique est totalement différent. En effet, le foyer ectopique étant maintenant d'origine ventriculaire, l'activation des ventricules se fait selon des voies aberrantes et non plus selon les voies de conduction physiologiques. Dans ces conditions, les complexes QRS présentent une morphologie très particulière (figure 11).

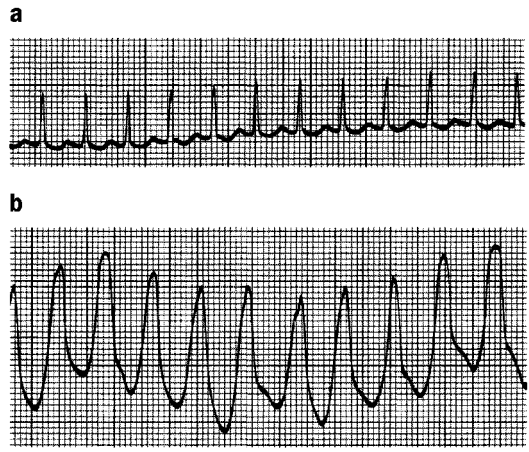


Figure 11 (d'après BERNE & LEVY, 1967, droits réservés)
a - tachycardie paroxystique supraventriculaire ; **b** - tachycardie ventriculaire

9. Troubles s'exprimant de façon discontinue et imprévisible. La fréquence d'apparition peut dans les cas extrêmes varier de plusieurs années à quelques heures

Les tachycardies ventriculaires paroxystiques sont beaucoup plus dangereuses que les arythmies supra-ventriculaires. En effet, l'activation ne passant plus par le filtre du nœud auriculo-ventriculaire, elle peut provoquer un véritable emballement de la fréquence cardiaque (200 à 250 par minute) qui risque de dégénérer en fibrillation ventriculaire (voir ci-dessous), une arythmie létale fréquemment précédée de tachycardies paroxystiques ventriculaires.

Au niveau cellulaire, les principales causes de foyers ectopiques sont reliées à l'ischémie qui touche très rapidement les phénomènes ATP dépendants de l'ATP et principalement le système d'échange transmembranaire entre le Na^+ et le K^+ (dit pompe NA-K) dont résulte le gradient important de potassium responsable du potentiel de repos (voir chapitre VIII, équation de NERNST). La diminution résultant de la concentration $[K^+]_{int}$ chez ces cellules ischémiques entraîne une diminution de leur potentiel de repos, qui les dépolarise au voisinage du seuil où elles deviennent susceptibles d'émettre spontanément un potentiel d'action.

3.4. LA FIBRILLATION AURICULAIRE OU VENTRICULAIRE

La **fibrillation** est une arythmie très particulière qui consiste en une dé-coordination totale des fibres cardiaques. Elle peut concerner le myocarde auriculaire ou le myocarde ventriculaire. Dans les deux cas, bien que chaque fibre conserve individuellement son activité contractile, leur désynchronisation totale fait que la résultante mécanique de cet ensemble de contractions est nulle : il en résulte globalement une absence de contraction organisée des oreillettes ou des ventricules.

Dans le cas de la fibrillation auriculaire, l'oreillette ne se contracte pas et ne participe donc pas au remplissage ventriculaire. Il n'y a pas d'ondes P sur l'électrocardiogramme, celles-ci étant remplacées par des fluctuations irrégulières du potentiel (figure 12a). L'activation du nœud auriculo-ventriculaire est aléatoire. Elle survient à des intervalles de temps qui peuvent être très variables d'un cycle à l'autre, cette variabilité entre dans l'apparition des complexes QRS conduisant de ce fait à une arythmie des contractions ventriculaires. Cependant, la fibrillation auriculaire n'a pas de conséquences hémodynamiques [10] vitales. Elle peut être supportée sur le long terme par les patients, sauf s'ils tolèrent difficilement l'arythmie ventriculaire qui en résulte.

Le contexte clinique est diamétralement opposé dans le cas de la fibrillation ventriculaire. Il s'agit là de l'arythmie cardiaque la plus grave, responsable de plus de 90% des morts subites par arrêt cardiaque.

---

10. L'hémodynamique s'applique à l'ensemble des lois physiques régissant la circulation sanguine dans tous les compartiments concernés par la circulation sanguine. Elle concerne principalement les pressions intraventriculaires, artérielles et veineuses, la débitmétrie, la vélocimétrie... (anciennement dénommée la physique cardio-vasculaire).

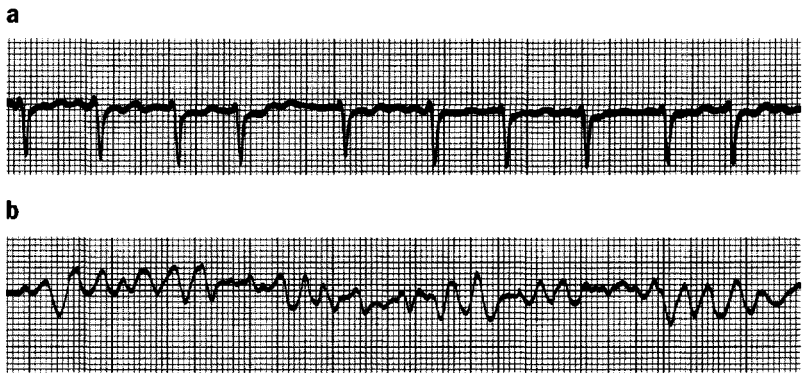


Figure 12 (d'après BERNE & LEVY, 1967, droits réservés)
a - fibrillation auriculaire ; **b** - fibrillation ventriculaire

La dé-coordination des fibres ventriculaires (voir annexe) se traduit immédiatement par absence de contraction des ventricules et donc par un arrêt de l'éjection du volume sanguin ventriculaire (figures 12b et 13). La pression artérielle chute immédiatement à une valeur nulle, la fibrillation étant assimilable à un arrêt cardiaque. La connaissance des mécanismes cellulaires à son origine réside principalement au niveau de la propagation de l'onde d'activation ventriculaire, dans la partie myocardique ventriculaire entre le niveau des fibres de PURKINJE à l'endocarde et l'épicarde (figure 6). Ces mécanismes ont beaucoup été étudiés à partir de méthodes de modélisation au cours des dix dernières années (voir annexe) et leur étude approfondie reste encore à l'heure actuelle du domaine de la recherche.

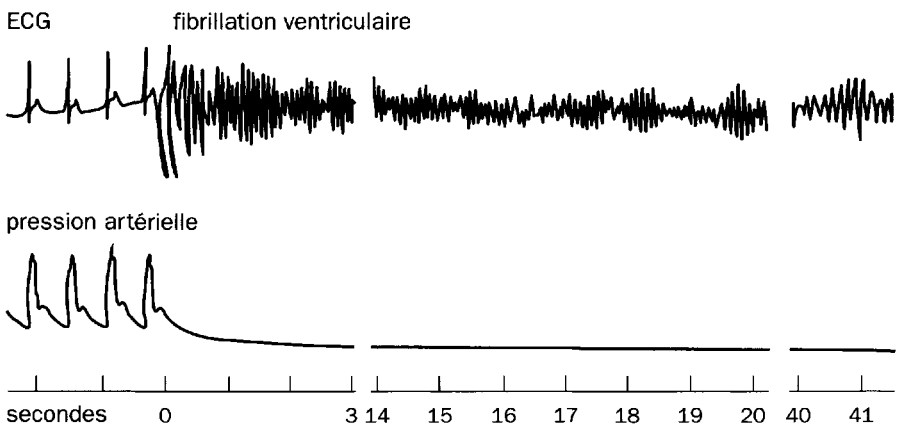


Figure 13 - Fibrillation ventriculaire (d'après TACKER & GEDDES, 1980)
La chute de la pression artérielle à zéro et l'irréversibilité spontanée de la fibrillation ventriculaire apparaissent clairement dans cet exemple.

Cette arythmie est spontanément irréversible. Le seul traitement actuellement efficace consiste à administrer un choc électrique trans-thoracique de haute énergie (200 à 300 joules) et ce dans un délai maximum de trois minutes : au-delà de ce

délai, l'interruption de la circulation provoque des dommages cérébraux irréversibles. En contexte chirurgical, un choc électrique d'énergie réduite (10 à 30 joules) peut directement être appliqué sur l'épicarde.

4. *CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*

Quand la fibrillation ventriculaire se produit en dehors du contexte hospitalier, les chances de survie sont excessivement faibles (moins de 5%) en fonction du contexte d'urgence dans lequel le choc doit être administré. Ceci a conduit au développement récent de défibrillateurs implantables chez les malades ambulatoires à haut risque. Ce type de thérapeutique, faisant appel à la haute technologie, entre actuellement dans une phase de développement. Il est cependant certain que le but ultime des recherches sur la fibrillation ventriculaire sera d'atteindre le plus haut niveau de compréhension de ses mécanismes de déclenchement et de maintien au sein du myocarde.

D'importantes approches par méthodes de modélisations ont été développées au plan de la compréhension des mécanismes générateurs de ces arythmies létales, principalement au cours de ces dix dernières années, qui ont permis une avancée importante de la connaissance dans ce domaine demeuré auparavant quasiment vierge. Ces méthodes (voir annexe) ont principalement été développées à partir d'automates cellulaires ou de modèles de type FITZUGH-NAGUMO (dont le principe a été exposé dans la section conclusions et perspectives du chapitre VIII).

Elles ont permis de montrer la puissance du potentiel explicatif et cognitif des méthodes de modélisation dont les résultats théoriques, tant au niveau des automates cellulaires qu'au niveau des modèles de type FITZUGH-NAGUMO ont été parfaitement validés *a posteriori* par les résultats expérimentaux. Ces éléments plaident fortement en faveur de la poursuite et du développement futur de ce type de méthodes au niveau des phénomènes électriques cellulaires et de leur propagation tissulaire permettant d'affiner le niveau cognitif sur les mécanismes fins de déclenchement de ce type d'arythmies.

Parallèlement à ces phénomènes électriques, un champ nouveau s'ouvre à la modélisation en cardiologie au niveau du couplage entre ces phénomènes électriques et les phénomènes mécaniques de contraction qu'ils engendrent. Il apparaît de plus en plus que les phénomène intracellulaires mis en œuvre dans ce couplage sont d'une extrême complexité et que leur dysfonctionnement peut avoir des conséquences importantes [HOPIE, 1998 & BERS, 2002]. Ces problèmes donnent à l'heure actuelle lieu à de très nombreux travaux expérimentaux [WIER & BALKE, 1999] et la porte est largement ouverte pour le développement de travaux de modélisation importants dans ce domaine actuellement à peine entrouvert par quelques précurseurs assez visionnaires tels que ceux de l'équipe d'Albert GOLDBETER [DUPONT & GOLDBETER, 1993, 1994 ; DUPONT *et al.*, 1996].

Enfin, l'étape ultime de ces perspectives de recherche consiste à développer des modèles permettant de reconstruire l'organe cœur dans son intégralité, de l'échelon moléculaire à celui du fonctionnement de l'organe entier. Elle permettra d'aborder de façon globale la compréhension, la caractérisation et l'interprétation de ces arythmies, dans le but de développer une stratégie de prévention de plus en plus précoce et efficace. Quelques tentatives sont à l'heure actuelle mises en œuvre [HERNANDEZ *et al.*, 2000 ; NOBLE, 2002], mais il ne s'agit que d'étapes très préliminaires devant l'ampleur de cette tâche qui permet d'envisager des perspectives de recherche multidisciplinaires durant plusieurs années, à moyen ou assez long terme.

RÉFÉRENCES

G.W. BEELER & R. REUTER - Reconstruction of the Action Potential of Ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* **268**, 177-210 (1977).

R.M. BERNE & M.N. LEVY - *Cardiovascular Physiology*. The C.V. Mosby Company, St.-Louis (1967).

D.M. BERS - Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* **415**, 198-205 (2002).

G. DUPONT & A. GOLDBETER - One-pool model for Ca^{++} oscillations involving Ca^{++} and inositol 1,4,5-trisphosphate as co-agonists for Ca^{++} release. *Cell Calcium* **14**, 311-322 (1993).

G. DUPONT & A. GOLDBETER - Properties of intracellular Ca^{++} waves generated by a model based on Ca^{++}-induced Ca^{++} release. *Biophys. J.* **67**, 2191-2204 (1994).

G. DUPONT, J. PONTES & A. GOLDBETER - Modeling spiral Ca^{++} waves in single cardiac cells: role of the spatial heterogeneity created by the nucleus. *Am. J. Physiol.* **271**, C1390-1399L (1996).

A. HERNANDEZ, G. CARRAULT, F. MORA & A. BARDOU - Overview of CARMEM: a new dynamic quantitative cardiac model for ECG monitoring and its adaptation to observed signals. *Acta Biotheoretica* **48**, 303-322 (2000).

L. HOPIE - *The Heart. Physiology from cell to circulation*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia-New-York (1998).

J. JALIFE, M. DELMAR, J.M. DAVIDENKA & J.M.B. ANUMONWO - *Basic cardiac electrophysiology for the clinician*. Futura Publishing Co Inc., Armonk, New-York (1999).

F. KAVALER, V.J. FISHER, J.H. STUCKEY & N.Y. BULL - *Acad. Med.* **41**, 592 (1965).

R.E. MC ALLISTER, D. NOBLE & R.W. TSIEN - Reconstruction of the electrical activity of cardiac Purkinje fibers. *J. Physiol. London* **251**, 1-59 (1975).

D. NOBLE - *The initiation of the heart beat*. Oxford University Press, Oxford (1975).

D. NOBLE - Modeling the heart-from genes to cells to the whole organ. *Science* **295**, 1678-1682 (2002).

R. REUTER - Divalent cations as charge carriers in excitable membrane. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **26**, 1-43 (1973).

R. REUTER & H.A. SCHOLZ - Study of the ion selectivity and the kinetics properties of the calcium-dependent slow inward current in mammalian cardiac muscle. *J. Physiol.* **264**, 17-47 (1976).

A.M. SCHER, M.I. RODRIGUEZ, J. LIIKANE & A.C. YOUNG. The mechanisms of atrioventricular conduction. *Circulation Res.* **3**, 535-542 (1959).

W.A. TACKER & L.A. GEDDES - *Electrical defibrillation*. CRC Press Inc., Boca Raton (1980).

W.G. WIER & C.W. BALKE - Ca^{++} release mechanisms, Ca^{++} sparks, and local control of excitation-contraction coupling in normal heart muscle. *Circ. Res.* **85**, 770-776 (1999).

ANNEXE IX

SIMULATION D'ONDES DE PROPAGATION ET FIBRILLATION VENTRICULAIRE

Alain BARDOU

L'étude des mécanismes responsables du développement et du maintien de la fibrillation ventriculaire représente une très bonne illustration de l'apport des modèles théoriques dans certains domaines de la biologie et de la médecine, en l'occurrence à la cardiologie.

En effet, les mécanismes de la fibrillation ventriculaire sont longtemps demeurés obscurs dans la mesure où leur étude expérimentale nécessitait l'enregistrement de la propagation de l'onde d'activation au sein du myocarde ventriculaire, enregistrement qui n'a été correctement réalisé que vers la fin des années 1980.

Face à cette limite expérimentale, certains auteurs ont tenté de développer des approches théoriques dans le but d'étudier par simulation les troubles de la propagation susceptibles d'intervenir au niveau du tissu cardiaque.

La première méthode utilisée pour tenter de réaliser ces simulations a été celle des automates cellulaires [11]. Elle a été appliquée initialement dans l'étude du myocarde auriculaire par MOE *et al.* [12], puis étendue à celle du myocarde ventriculaire, principalement par AUGER, BARDOU et col. [13] ainsi que par SMITH et COHEN [14] dans le courant des années 1980.

A partir de cette méthode, la démarche mise en œuvre consistait à introduire, au sein d'une matrice d'automates cellulaires de taille variable (typiquement de

---

11. Voir L. EDELSTEIN-KESHET - *Mathematical Models in Biology*. McGraw Hill (originally published by Random House/Birkhauser) (1998).

12. G.K. MOE, W.C. RHEINBOLDT & J.A.A. ABILDSKOV - Computer model of atrial fibrillation. *Am. J. Heart* **67**, 200-220 (1964).

13. P.M. AUGER, A. COULOMBE, M.C. GOVAERE, J.M. CHESNAIS, D. VON EUW & A. BARDOU - Computer simulation of different mechanisms of ventricular fibrillation and defibrillation. *Innov. Technol. Biol. Med.* **10**, 299-312 (1984).
P.M. AUGER, A. BARDOU, A. COULOMBE & J. DEGONDE - Computer simulation of different mechanisms of ventricular fibrillation. *Proceedings of the 9th IEEE/EMBS International Conference*, 171-174 (1987).
P.M. AUGER, A. BARDOU, A. COULOMBE & J. DEGONDE - Computer simulation of different electrophysiological mechanisms of ventricular fibrillation. *Comput. in Cardiol.* **87**, 527-530 (1988).
P.M. AUGER, A. COULOMBE, P. DUMÉE, M.C. GOVAERE, J.M. CHESNAIS & A. BARDOU Computer simulation of cardiac arrhythmias and of defibrillating electric shosks. Effects of anti-arrhythmic drugs. *In :* Non linear coherent structures in Physics and Biology. M. REMOISSENET & M. PEYRARD Eds. *Lecture Notes in Physics* **393**, 133-140, Springer Verlag, Heidelberg (1990).

14. J.M. SMITH & R.J. COHEN - Simple computer model predicts a wide range of ventricular dysrhythmias. *PNAS* **81**, 233-237 (1984).

64×64 à 512×512 éléments), quelques cellules atypiques dont les propriétés étaient modifiées pour traduire leur réponse à l'**ischémie**. La propagation simulée des ondes d'activation dans la matrice, résultant de ces modifications introduites au niveau de quelques cellules, permettait d'étudier par analogie les défauts de propagation dans le tissu ventriculaire.

Ces travaux ont permis de montrer que certains précurseurs électrophysiologiques de la fibrillation ventriculaire, tels que les blocs unidirectionnels (voir § 3.2), avaient un effet majeur sur la propagation. Ils induisent un phénomène de retour sur elle-même de l'onde incidente d'activation ventriculaire, développant au sein du myocarde un vortex auto-entretenu qui, correspondant à une dé-coordination des fibres cardiaques, est assimilable à une fibrillation ventriculaire (figure AIX.1)[15].

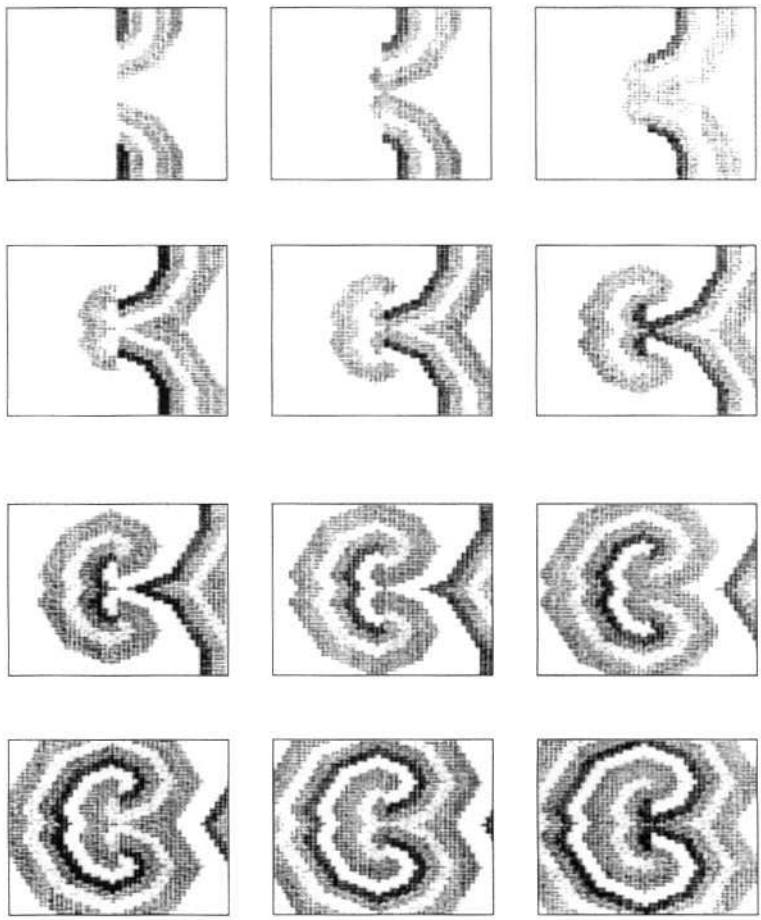


Figure AIX.1 - Développement d'un vortex dans le myocarde simulé par automates cellulaires par introduction d'un bloc unidirectionnel (d'après [15])

15. P. AUGER, A. COULOMBE, M.C. GOVAERE, M. CHESNAIS, D. VON EUW & A. BARDOU - Computer simulation of mechanisms of ventricular fibrillation and defibrillation. *Innov. Technol. Biol. Med.* **10**, 299 312 (1989).

Ce type de vortex correspondait en fait à la première description d'un phénomène parfaitement connu à l'heure actuelle sous le terme générique de « réentrée ». De plus, il conduisait au développement d'ondes spirales lorsqu'une propagation anisotrope dans les directions longitudinales et transversales (par rapport au sens des fibres cardiaques dans le myocarde) était simulée (figure AIX.2). Ces phénomènes ont été généralisés à l'ensemble des milieux excitables par MARKUS et HESS en 1990 [16].

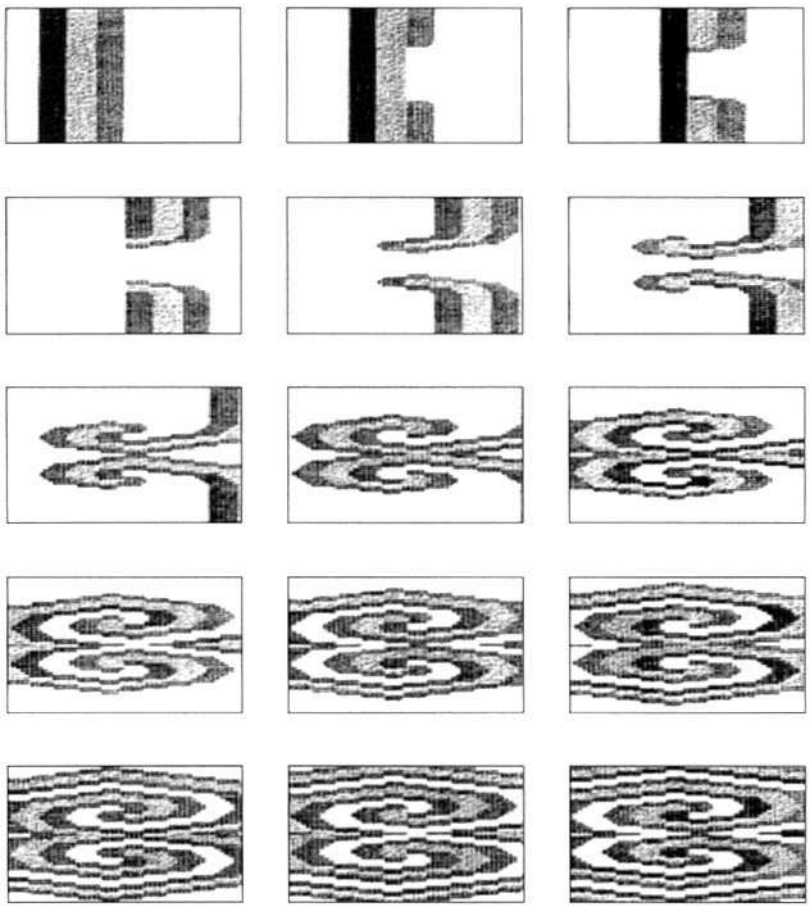


Figure AIX.2 - Développement d'ondes spirales dans un myocarde simulé par automates cellulaires en tenant compte des propriétés anisotropes du myocarde (d'après [15])

Parallèlement, des modèles plus complexes, reposant sur des réseaux à éléments couplés (*coupled map lattices*), ont été développés pour simuler la propagation dans le tissu cardiaque. Dans ce cas, chaque cellule est décrite non plus par un

16. M. MARKUS & B. HESS - Isotropic cellular automaton for modeling excitable media. *Nature* **347**, 56-58 (1990).

automate cellulaire, mais par un système d'équations différentielles dérivées du modèle théorique D'HODGKIN et HUXLEY [17] (8) (voir chapitre VIII). L'apparition de ces modèles a été liée aux possibilités d'accès à des moyens informatiques puissants permettant de traiter un grand nombre d'équations non-linéaires. Les premiers modèles de ce type sont principalement :

- ✓ le modèle de VAN CAPELLE et DURRER [18], basé sur une version simplifiée du modèle d'HODGKIN-HUXLEY qui introduit un paramètre global d'excitabilité Y, représentatif des paramètres m, n et h (voir chapitre VIII, § 2),
- ✓ les modèles de WINFREE [19], de THAKOR [20] et de ROBERGE [21], utilisant les équations de BEELER et REUTER [22] (voir § 1). Les résultats obtenus avec ces modèles ont parfaitement confirmé les dynamiques de vortex et de réentrées mises en évidence par les automates cellulaires.

Ce n'est qu'*a posteriori* que le développement de méthodes fiables de cartographie cardiaque (cardiac mapping) a permis de mettre en évidence expérimentalement l'existence de ces phénomènes de réentrées en permettant l'enregistrement direct de cartes isochrones et isopotentielles au niveau du tissu cardiaque. La figure AIX.3 donne un exemple de l'enregistrement direct de telles cartes isochrones au cours d'un épisode de réentrée [23].

L'existence des ondes spirales mises en évidence au niveau théorique par les automates cellulaires dès le milieu des années 1980 (figure AIX.2) a été remarquablement mise expérimentalement en évidence au milieu des années 1990 par le groupe de JALIFE sur lambeau ventriculaire de mouton à partir de méthodes de cartographie optique [24].

Des résultats plus récents utilisant les automates cellulaires concernent les réentrées de type percolation, provoquées principalement par la dispersion de la durée des potentiels d'action des cellules myocardiques ventriculaires au cours de l'infarctus

---

17. A.L. HODGKIN & A.F. HUXLEY - A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* **117**, 500-544 (1952).
18. F.J. VAN CAPELLE & D. DURRER - Computer simulation of arrhythmias in a network of coupled excitable elements. *Circ. Res.* **47**, 454-466 (1980).
19. A.T. WINFREE - Vortex action potentials in normal ventricular muscle. *Ann. N-Y. Acad. Sciences* **591**, 190-207 (1990).
20. N. THAKOR & L.N. EISENMAN - Three-dimensional computer model of the heart fibrillation induced by extrastimulation. *Comput. Biomed. Res.* **22**, 532-545 (1989).
21. F. ROBERGE, A. VINET & B. VICTORI - Reconstruction of propagated electrical activity in a two-dimensinal model of anisotropic heart muscle. *Circ. Res.* **58**, 461-475 (1986).
22. G.W. BEELER & R.J. REUTER - Reconstruction of the action potential of myocardial ventricular fibers. *Physiol.* **268**, 177-210 (1977).
23. A. BARDOU, P. AUGER, R. CARDINAL, P. DUMÉE, P.J. BIRKUI, D. VON EUW & M.C. GOVAERE - Theoretical study by means of computer simulation of conditions in which extrasystoles can trigger ventricular fibrillation. Validation by epicardial mappings. *J. Biol. Systems* **1**, 147-158 (1993).
24. A.M. PERTSOV, J.M. DAVIDENKO, R. SALOMONSZ, W.T. BAXTER & J. JALIFE - Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. *Circ. Res.* **72**, 631-650 (1993).

du myocarde, même mineur [25]. Ces résultats théoriques semblent également sur le point d'être cliniquement validés par la mise en évidence de plus en plus importante du rôle majeur de la dispersion de l'espace QT de l'ECG : directement lié à la dispersion de la durée des potentiels d'action cellulaires du myocarde ventriculaire, ce facteur constituerait en effet l'un des signes précurseurs de la mort subite par arrêt cardiaque [26].

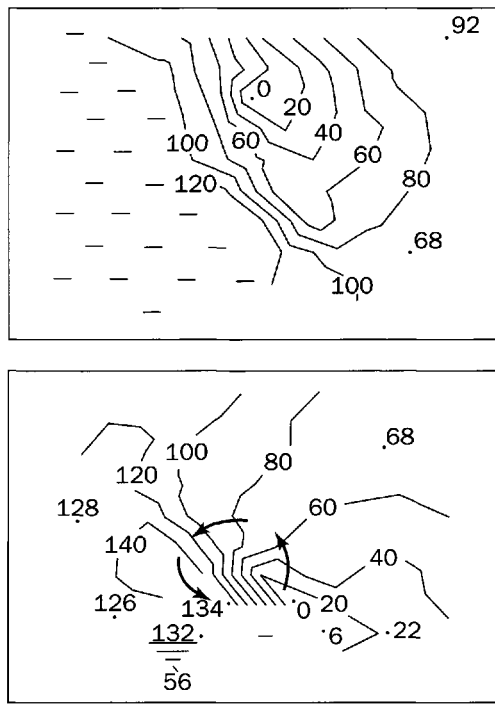


Figure AIX.3 - Enregistrement expérimental par cardiac mapping d'un vortex de réentrée sur myocarde ventriculaire canin consécutif à un bloc transitoire
(d'après BARDOU *et al.*, 1993)
Seul le bord supérieur est visible en fonction de la taille de la plaque d'enregistrement.

D'autres types de modèles, principalement le modèle de FITZUGH-NAGUMO (voir *Conclusions et perspectives* du chapitre VIII) ont également été appliqués à l'étude des phénomènes propagés et de leur rôle dans la genèse de la fibrillation ventriculaire. Les principaux travaux à partir de ce type de modèle ont été développés par

25. A. BARDOU, P. AUGER & J.L. CHASSÉ - Effects of local ischemia and transient conduction blocks on the induction of cardiac reentries. *Int. J. Bifurcation Chaos* **6**, 1657-1664 (1996).

26. C.S. BARR, A. NAAS, M. FREEMAN, C.C. LANG & A.D. STRUTHERS - QT dispersion and sudden unexpected death in chronic heart failure. *Lancet* **343**, 327-329 (1994).
J.M. CLANCY, C.J. GARRAT, K.L. WOODS & D.P. DE BONO - QT dispersion and mortality after myocardial infarction. *Lancet* **345**, 945-948 (1995).
M.K. BATUR, S. AKSOYEK, A. OTO, A. YLIDRIR, N. OZER , E. ATALAR, K. AYTEMIR, G. KABAKCI, K. OVUNK, F. OZNEM & S. KES - Circadian variations of QT dispersion: is it a clue to morning increase of sudden cardiac death? *Clinical Cardiology* **22**, 103-106 (1999).

STARMER *et al.*[27] pour étudier les phénomènes de vulnérabilité dans un milieu excitable et par PERSTOV *et al.*[22], de l'équipe de José JALIFE, pour étudier les phénomènes de réentrées et le développement d'ondes spirales induites par l'anisotropie cardiaque dans la genèse de la fibrillation ventriculaire. Ces deux travaux ont donné des résultats originaux, notamment ceux de PERSTOV *et al.* qui ont permis de décrire au plan théorique des phénomènes de réentrée très particuliers (et liés de façon très dangereuse à l'anisotropie myocardique), parfaitement validés par l'expérimentation menée *a posteriori* à partir de travaux effectués en mapping optique sur lame mince de myocarde déjà abordés dans ce paragraphe[22].

Pour approfondir ces différents aspects de la modélisation cardiaque, le lecteur pourra se référer à la revue générale de BARDOU *et al.*[28], contenant de nombreuses sources bibliographiques.

27. C.F. STARMER, V.N. BIKTASHEV, D.N. ROMASHKO, M.R. STEPANOV, O.N. MAKAROVA, V.I. KRINSKY - Vulnerability in a vulnerable medium: analytical and numerical studies of initiating unidirectional propagation. *Biophys. J.* **65**, 1775-1787 (1993).

28. A. BARDOU, P. AUGER, P. BIRKUI & J.L. CHASSE - Modeling of cardiac electrophysiological mechanisms: from action potential genesis to its propagation in myocardium. *CRC Critical Reviews in Biomed. Engin.* **24**, 141-221 (1996).

Chapitre X

ELÉMENTS DE NEUROPHYSIOLOGIE

Patrick MOUCHET

Toutes les fonctions exercées par le système nerveux sont réalisées grâce à l'activité de cellules appelées neurones. Bien que ces fonctions soient très diverses (motricité, contrôle du milieu intérieur [1], fonctions cognitives par exemple), le neurone constitue une unité fonctionnelle dont les propriétés conditionnent fortement chacune de ces fonctions intégrées. Le texte présenté ici est destiné à donner une brève description des principales propriétés des cellules nerveuses. Notre objectif est que ce chapitre, associé au chapitre VIII, constitue pour le lecteur un corpus de connaissances de base lui permettant d'aborder ensuite les domaines particuliers de la neurophysiologie susceptibles de l'intéresser.

1. INTRODUCTION

Ce chapitre s'intéresse aux propriétés des neurones, que nous définissons non seulement comme les propriétés de cellules individuelles, mais également par les formes élémentaires d'interconnections entre ces cellules. L'organisation de ces connections a en effet une influence considérable sur la nature des opérations effectuées par telle ou telle partie du système nerveux. Parmi une multitude de telles opérations, on peut mentionner l'exemple du début de l'analyse des scènes visuelles par la rétine ou encore celui de la séquence des commandes envoyées aux muscles lors de la marche, pour ne citer que deux fonctions primordiales pour la survie des espèces terrestres. C'est pourquoi l'exposé des caractéristiques fonctionnelles les plus importantes du neurone sera complété par la présentation de quelques éléments de connectivité.

---

1. Le terme milieu intérieur désigne l'espace liquidien dans lequel vivent les cellules constitutives de l'organisme. Il est formé à partir du plasma sanguin. Sa stabilité et son adaptation aux modifications susceptibles d'affecter l'organisme (adaptation des besoins énergétiques lors de l'effort, exposition prolongée au froid par exemple) sont donc vitales et l'ensemble des processus qui les assure est appelé homéostasie. Le système nerveux y participe de manière importante (les exemples du contrôle de la pression du sang dans les artères et du contrôle de la température corporelle peuvent être mentionnés ici parmi beaucoup d'autres).

Avant d'aborder ces différents points, deux limitations de l'exposé doivent être indiquées. Tout d'abord, nous ne parlerons pratiquement pas des cellules gliales, cellules non-neuronales présentes aux côtés des cellules nerveuses en nombre plus grand que les neurones [2]. Cette limitation s'est imposée afin de ne pas alourdir ce chapitre, mais aussi parce que le rôle de ces cellules dans le traitement de l'information véhiculée par les cellules nerveuses est encore fort mal connu. Par contre, ces cellules, qui forment ce qu'on appelle la **glie**, ont des fonctions d'entretien, en particulier nourricières, bien établies.

La seconde limitation de cet exposé est de présenter des exemples et des données chiffrées concernant essentiellement le système nerveux des vertébrés [3]. La raison de cette limitation est à nouveau un souci de concision, mais elle est également justifiée par le fait que, en dépit des différences importantes qui existent entre les systèmes nerveux des vertébrés et des invertébrés [4], ces deux systèmes sont régis par des principes communs.

2. *LE NEURONE*

2.1. *PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES*

Deux éléments caractérisent le neurone et jouent un rôle déterminant vis-à-vis de ses propriétés fonctionnelles : ses particularités morphologiques et la présence d'une membrane excitable. La morphologie d'un neurone est d'une grande richesse et les classifications détaillées auxquelles elle donne lieu sont beaucoup plus qu'un simple divertissement d'anatomiste, car cette morphologie influence fortement la manière dont un neurone donné traite et transmet les informations qu'il reçoit. Les propriétés des membranes excitables ont déjà été abordées en partie dans le chapitre VIII. Elles seront détaillées à nouveau dans les paragraphes suivants dans le contexte de la propagation d'un influx nerveux.

2.1.1. *Morphologie*

Sur un plan morphologique, un neurone type est formé de deux parties : un corps cellulaire (le soma) et des prolongements membranaires appelés neurites (figure 1a).

---

2. B. KAST - The best supporting actors. *Nature* **412**, 674-676 (2001).
3. Il y a toutefois deux exceptions à cette limitation : les processus de genèse et propagation active des signaux nerveux sont décrits selon le formalisme proposé par HODGKIN et HUXLEY à partir de travaux effectués chez un invertébré (le calmar) et l'exemple de réseau neuronal biologique présenté en annexe est issu d'expériences effectuées chez les insectes.
4. G. LAURENT - Dendritic processing in invertebrates: a link to function. *In :* G. STUART, N. SPRUSTON & M. HÄUSSER - *Dendrites*. Oxford Univ. Press, 290-309 (1999).

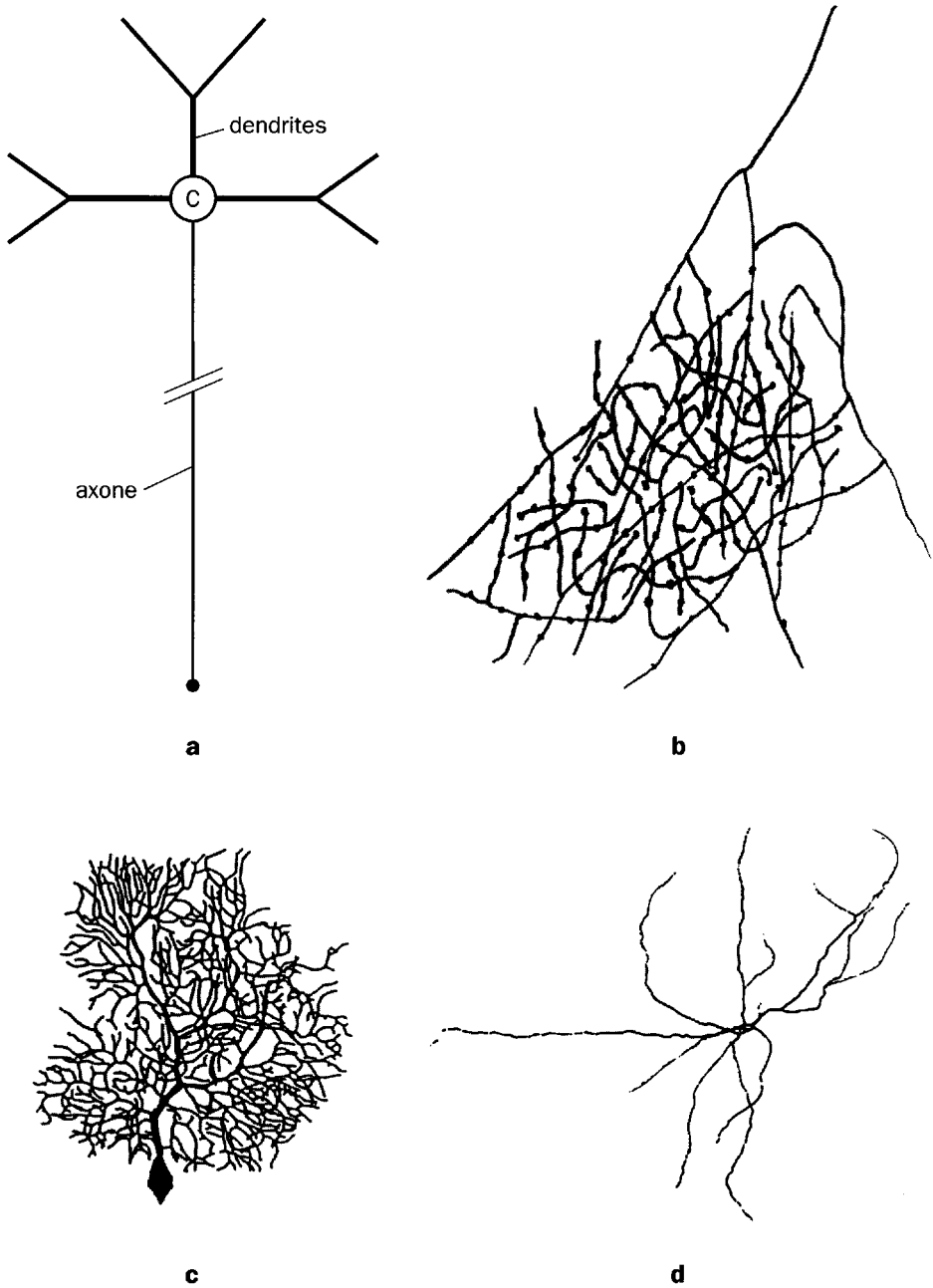


Figure 1 - Exemples de morphologies neuronales

a - représentation schématique d'un neurone. C = corps cellulaire.
b - exemple de ramification terminale d'un axone
c - arborisations dendritiques d'une cellule de PURKINJE de cervelet (d'après RAPP *et al.*, 1994)
d - arborisations dendritiques d'un neurone pallidal (d'après un dessin de J. YELNIK)

Les neurites sont en général ramifiés, un tronc primaire donnant naissance à un nombre variable de branches. Quand on parle de cellule nerveuse sans plus de précision, on désigne aussi bien le soma que ses prolongements.

Le corps cellulaire, qui contient le noyau, est tout à fait banal, tant par ses dimensions (de 10 à 50 microns en moyenne pour son diamètre) que par sa constitution (voir chapitre I). Les prolongements membranaires sont en revanche spécifiques du neurone. Ils se répartissent en deux groupes radicalement distincts, l'axone et les dendrites, qui possèdent des fonctions différentes :

- ✓ les dendrites ont essentiellement une fonction de réception et de traitement des informations, bien que pour certains neurones ils puissent également assurer un rôle de transmission,
- ✓ l'axone sert à transmettre vers d'autres cellules les informations traitées par le neurone. Il correspond à ce que l'on appelle communément la fibre nerveuse (voir chapitre VIII).

Corps cellulaire et dendrites se trouvent dans la substance grise, où ils forment les différents centres nerveux. Ces derniers correspondent donc à une entité anatomique. Ils sont de formes et de tailles très différentes. Certains sont au service d'une seule fonction (la vision pour la rétine par exemple), d'autres participent au contraire à plusieurs fonctions. Une partie des axones constitue la substance blanche. Dans ce cas, ils sont entourés d'une gaine lipidique, la myéline, qui est formée par des cellules distinctes appartenant à la glie. Cette gaine constitue un manchon cylindrique autour de chaque axone myélinisé, manchon interrompu à intervalles réguliers (tous les 0,5 mm environ). Ces brèves interruptions portent le nom de nœuds de RANVIER : elles constituent les seules zones où l'axone est en contact direct avec le milieu extra-cellulaire. Ces nœuds de RANVIER jouent un rôle essentiel dans la propagation des signaux nerveux sur la fibre myélinisée (voir plus loin, § 2.2.2).

In vivo, il n'existe qu'un seul tronc axonal primaire. Par contre, l'existence de ramifications axonales est la règle (figure 1b). L'axone naît en général au niveau du corps cellulaire, mais dans un nombre appréciable de cas (au moins la moitié des neurones dans certaines parties du cerveau) cette naissance peut se produire aussi au niveau d'un dendrite.

Les troncs dendritiques primaires sont au contraire généralement multiples. Les dendrites sont très souvent ramifiés, mais ce n'est pas toujours le cas. En outre, il existe deux grandes catégories de dendrites, qualifiés respectivement de lisses et épineux. Les dendrites épineux sont appelés ainsi car ils portent de petites excroissances membranaires ayant l'aspect d'épines en microscopie optique. En fait, leur examen en microscopie électronique montre qu'ils ont une forme plus arrondie. Ces épines, qui sont toujours une zone de contact interneuronale, ont vraisemblablement une grande importance fonctionnelle, notamment dans les tâches d'apprentissage. Les dendrites d'un même neurone sont soit tous lisses, soit tous épineux (de très rares épines peuvent toutefois s'observer sur certains dendrites lisses).

Tout en se conformant à la morphologie typique qui vient d'être décrite, les neurones se caractérisent également par une très grande variabilité de leurs morphologies.

En plus de la distinction lisse-épineux déjà mentionnée, la diversité des dendrites est considérable, liée surtout à des différences dans la géométrie de leurs arborescences. La diversité géométrique des arbres dendritiques est utilisée pour classer les neurones selon des familles, d'une manière analogue aux classifications utilisées en botanique pour décrire la morphologie des arbres et autres espèces végétales arborescentes (figure 1c et d). Chaque famille est spécifique d'un centre nerveux particulier (cellules pyramidales du cortex cérébral, **cellules de PURKINJE** du cortex cérébelleux), tandis que chaque centre contient le plus souvent d'autres espèces neuronales (il existe ainsi également dans le cortex cérébelleux des cellules en panier, des cellules étoilées, des cellules dites granulaires). La longueur des dendrites n'est jamais importante. Les plus longs dépassent rarement 1 mm et beaucoup de types cellulaires ont des dendrites de l'ordre de 500 µm ou moins de longueur maximale.

La variabilité des axones s'observe au contraire d'abord de manière frappante par des différences de longueur qui couvrent un large éventail de valeurs entre deux situations extrêmes. L'axone peut être très court (réduit à zéro même, car il existe des neurones sans axone) ou immensément long. Ils peuvent atteindre plusieurs mètres pour les axones sensitifs de certaines espèces et environ deux mètres chez l'homme, ce qui est énorme pour des éléments dont le soma a des dimensions usuelles pour une cellule (une taille de quelques dizaines de micromètres), le diamètre axonal n'excédant pas 6 µm.

Ces différences considérables dans la longueur axonale permettent une classification simple et fort utile des cellules nerveuses en interneurones, dont l'axone, nécessairement court, reste confiné dans la structure où se trouve le soma, et en neurones de projection, dont l'axone sort au contraire de la structure d'origine pour se rendre dans un autre centre nerveux (figure 2). D'un type neuronal à l'autre, il existe également d'importantes différences portant sur le diamètre des axones et sur la forme et le nombre de leurs branchements.

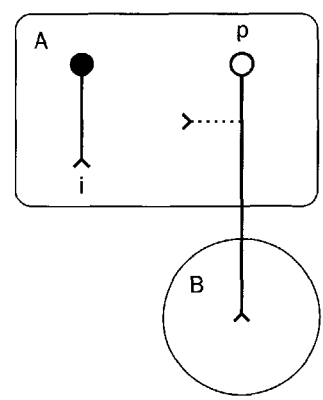


Figure 2
Interneurones et neurones de projection
L'interneurone i a un axone confiné dans le centre A. p est un neurone de projection du même centre, qu'il met en relation avec le centre B. Le trait pointillé indique qu'un neurone de projection peut émettre des collatérales axonales locales lui permettant d'agir aussi sur les cellules de A.

Dans la très grande majorité des cas, l'axone se termine à proximité d'autres cellules nerveuses auxquelles il communique les informations qu'il a véhiculées. Toutefois, certains axones se terminent au contact de cellules non nerveuses, comme des fibres musculaires ou des cellules sécrétrices.

2.1.2. Autres caractéristiques des neurones

Les propriétés métaboliques des neurones sont les mêmes que celles des cellules non-nerveuses. Les organites qu'ils contiennent sont également les mêmes que ceux des autres cellules (voir chapitre I). Deux points sont cependant à mentionner :

- ✓ chez l'adulte, on a longtemps admis que les neurones ne pouvaient plus se diviser, cette caractéristique se retrouvant chez l'autre type cellulaire pourvu d'une membrane excitable, la cellule musculaire. Une conséquence directe de ce principe est une décroissance continuelle du nombre de neurones à partir de l'age adulte, puisque les cellules mortes ne sont pas remplacées. Depuis quelques années, des exceptions à cette règle sont progressivement découvertes sans que l'on puisse encore en estimer l'ampleur ni les conséquences fonctionnelles. En revanche, la capacité à bourgeonner qu'ont certaines terminaisons axonales est bien établie. Ces bourgeonnements peuvent ainsi se substituer à des terminaisons voisines disparues par mort cellulaire.
- ✓ les prolongements neuronaux, et en particulier l'axone, sont parcourus en permanence par un flux bidirectionnel de matière, soit antérograde (du soma aux extrémités), soit rétrograde (des extrémités au soma). Ces flux sont regroupés sous le terme de flux axoplasmique, compte tenu de leur amplitude au niveau axonal, où ils sont très faciles à mettre en évidence. Le flux axoplasmique a un rôle nourricier et très certainement aussi un rôle de signalisation biochimique. Son importance expérimentale est grande, car il constitue chez l'animal la source essentielle des données concernant l'anatomie des connexions nerveuses (voir § 4.4).

2.2. PROPRIÉTÉS ÉLECTRIQUES DES NEURONES

2.2.1. Structure électrotonique

Les propriétés électriques des neurones sont extrêmement importantes, car les opérations de traitement et de propagation de l'information spécifique véhiculée par ces cellules reposent sur elles.

Comme pour toute cellule, la membrane plasmique du neurone est polarisée électriquement. Elle sépare un milieu intra-cellulaire d'un milieu extra-cellulaire ayant un potentiel électrique plus élevé. Cette différence de potentiel (introduite au chapitre VIII) est appelée potentiel de repos (PR). Le PR est de l'ordre de quelques dizaines de millivolts et, pour les neurones, il se situe en moyenne autour de – 60 à – 70 mV. Le milieu extra-cellulaire est considéré comme iso-potentiel.

Le PR est dû à l'existence d'une perméabilité sélective de la membrane, qui ne laisse passer que certains ions, créant ainsi une distribution inhomogène des charges électriques de part et d'autre de la membrane (voir chapitre VIII). Certaines espèces ioniques sont particulièrement concernées par cette perméabilité sélective. Ainsi les ions sodium, calcium et chlore sont en sur-concentration dans le milieu extra-cellulaire, alors que le milieu intra-cellulaire est sur-concentré en ions potassium. La membrane est très peu perméable aux ions sodium, calcium et potassium, sans être pour autant infranchissable par ces ions. Il existe donc des mécanismes de **transports actifs**, gros consommateurs d'énergie, qui maintiennent en permanence l'inhomogénéité de la distribution des charges, assurant sur le long terme la polarisation de la cellule. Des augmentations transitoires des mouvements trans-membranaires de ces ions sont à l'origine de courants (voir chapitre VIII) sur lesquels reposent les capacités de signalisation des neurones.

La description des propriétés électriques du neurone fait appel à une représentation qu'on a l'habitude d'appeler circuit électrique équivalent à la membrane (voir aussi la figure 6 du chapitre VIII). Dans cette représentation (figure 3), chaque élément de membrane est assimilé au circuit formé par une capacité placée en parallèle avec une résistance, cette dernière étant en série avec une batterie qui représente l'inhomogénéité de la distribution trans-membranaire des charges, puisque celle-ci est en dernier ressort la source de la force électromotrice responsable des courants trans-membranaires.

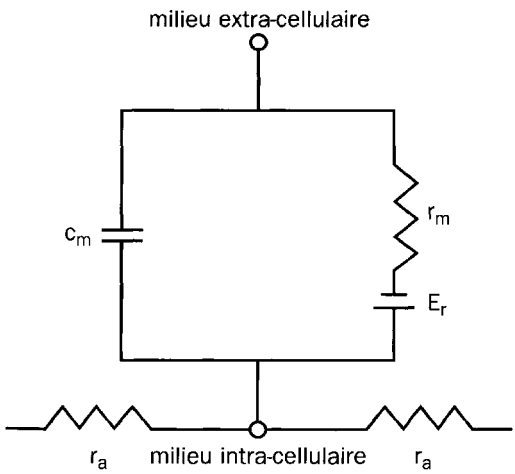


Figure 3 - Schéma représentatif du circuit électrique équivalent à la membrane

Ce dispositif met en relation les milieux intra- et extra-cellulaires. Les différents éléments de membrane ainsi représentés sont couplés longitudinalement par des résistivités qui modélisent les propriétés électriques du cytoplasme. La résistivité membranaire est beaucoup plus élevée que la résistivité intra-cytoplasmique.

Ce schéma équivalent rend compte des courants électriques propagés sur les dendrites et le long des axones [5]. Ces courants sont physiologiques (intrinsèques) ou imposés artificiellement :

✓ le premier cas correspond à l'activité physiologique des neurones, au cours de laquelle des charges franchissent d'abord la membrane au niveau des zones de communication interneuronales, les synapses (voir § 3),

✓ le second cas correspond à une injection expérimentale ou à visée thérapeutique de charges électriques, que cette injection se fasse dans le milieu extra-cellulaire ou à l'intérieur même du neurone.

Dans tous les cas, les courants sont propagés selon un processus qui dépend du modèle théorique représenté par le circuit équivalent décrit plus haut. L'écriture de la loi de conservation des courants au niveau d'un élément cylindrique de fibre modélisé par ce circuit permet d'établir l'équation qui régit leur propagation dans les neurites. Il s'agit de ce qu'on appelle l'équation du câble :

$$\lambda^2 \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} - \tau \frac{\partial V}{\partial t} - V = 0 \qquad (1)$$

où : V (en mV) représente la différence entre le potentiel trans-membranaire et le potentiel de repos (PR). Pour alléger la formulation, dans toute la suite on dira potentiel trans-membranaire en parlant de V, mais en gardant à l'esprit qu'il s'agit en fait de l'écart de ce potentiel par rapport à sa valeur de repos. Cette simplification est justifiée par l'homogénéité du potentiel électrique du milieu extra-cellulaire [RALL,1977],

λ est la constante électrotonique spatiale du neurite. Elle correspond à la distance qu'une variation de V, due à un courant stationnaire, doit parcourir pour être atténuée à 1/e de sa valeur. Elle représente aussi la longueur du cylindre neuritique pour laquelle la résistance axiale est égale à la résistance membranaire. Pour une portion de dendrite de longueur l, on appelle longueur électrotonique L le rapport l/λ,

τ est la constante de temps membranaire.

Le temps t est exprimé en ms et x (en cm) représente la position, sur le neurite, du point où V est évalué.

L'examen montre que trois grandeurs électriques régissent le comportement électrique de base du neurone : r_a, r_m et c_m (figure 2).

✓ r_a (en Ω .cm) est la résistivité intra-cytoplasmique du neurite. Elle caractérise la résistance à l'écoulement longitudinal des courants dans les prolongements

5. Ce schéma électrique rend compte aussi de la propagation au niveau du corps cellulaire, mais c'est sur les dendrites que se fait l'essentiel du traitement de l'information. A leur niveau, traitement et propagation sont en fait indissociables. Notons également que la géométrie, équivalente à une longue chaîne de cylindres présentant des bifurcations, interfère très fortement avec les propriétés du circuit électrique élémentaire. Ce schéma est une forme plus simple de celui présenté sur la figure 6 du chapitre 8 comportant, en plus, les résistances R_K et R_{Na} qui dépendent du potentiel V (défini plus loin), alors que la résistance R_L correspond à la résistance désignée ici par r_m (figure 3).

neuronaux. Elle est constante pour un même neurone et varie peu d'un neurone à un autre,

✓ c_m (en F/cm^2) est la capacité spécifique de la membrane, c'est-à-dire la capacité d'une unité de surface membranaire,

✓ r_m (en Ω .cm^2) traduit la résistivité membranaire (c'est en fait la résistance d'une unité de surface de membrane) ; elle peut beaucoup varier d'un neurone à un autre.

Les paramètres (λ, τ) de l'équation du câble s'expriment comme des combinaisons de ces trois grandeurs électriques et de la géométrie du neurite, avec :

$$\lambda = \sqrt{\frac{D}{4}\frac{r_m}{r_a}}$$, D étant le diamètre du neurite,

$$\tau = r_m c_m .$$

Contrairement à la résistivité intra-cytoplasmique r_a qui est une constante pour le neurite considéré, la résistivité membranaire r_m peut varier d'une région à une autre du neurone, ainsi qu'au cours du temps. Cela fait de r_m une grandeur clé pour la régulation de l'activité neuronale. En fait, le rôle de r_m est encore plus crucial car sa valeur peut dépendre de V. Cette éventuelle dépendance de r_m vis-à-vis de V induit un comportement électrique non-linéaire du neurite.

Pour caractériser le comportement électrophysiologique de la cellule nerveuse, des paramètres morphologiques doivent être considérés en plus de ces grandeurs électriques. Outre le diamètre D, apparaissant déjà dans l'expression de la constante électrotonique, la longueur et le nombre des dendrites, ainsi que la surface du soma sont à prendre en compte. Ces paramètres sont évidemment très variables d'un neurone à un autre et, pour ce qui est des dendrites, d'une partie du neurone à une autre. L'ensemble formé par r_a, c_m et r_m d'une part et les paramètres morphologiques d'autre part, détermine ce qu'on a coutume d'appeler la structure électrotonique du neurone.

Physiologiquement, le comportement du neurone est donc décrit entièrement par l'évolution d'une seule grandeur, la différence de potentiel trans-membranaire V. Pour des raisons de commodité expérimentale, celle-ci est en général enregistrée au niveau du corps cellulaire, sa mesure au niveau des neurites étant en effet d'une grande difficulté.

Selon les conditions de mise en jeu auxquelles on s'intéresse, un terme décrivant soit un courant expérimentalement injecté dans le neurone, soit les courants synaptiques (voir § 3.2.1) est ajouté dans l'équation du câble.

2.2.2. Phénomènes régénératifs

On sait depuis longtemps que certaines portions de la membrane neuronale ont une résistance qui dépend du voltage, mais on pensait que cette propriété ne concernait que la membrane du soma et celle de l'axone, où les conséquences du phénomène

ont été bien étudiées. On sait maintenant que, pour beaucoup de neurones, la résistance membranaire des dendrites dépend également du voltage trans-membranaire.

Le mode de propagation des modifications de potentiel trans-membranaire qui s'observe alors est appelé « propagation active » ou « mode de propagation régénératif ». Il reste toutefois utile de caractériser le comportement des dendrites en mode linéaire, ce que les physiologistes ont l'habitude d'appeler « propagation passive des potentiels trans-membranaires », brièvement décrite au paragraphe précédent.

La dépendance de la résistance membranaire vis-à-vis du voltage est due à la présence dans cette dernière de **protéines** dont la **conformation** dépend du voltage trans-membranaire. Ces protéines sont des **canaux ioniques** dont les propriétés dépendent en effet de la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane. Les propriétés de ces canaux et leurs conséquences sur l'électrophysiologie cellulaire ont été décrites dans le chapitre VIII consacré à l'électrophysiologie cardiaque et nous n'y reviendrons pas ici. La nature des phénomènes est en effet la même, qu'il s'agisse de la fibre musculaire ou du neurone. Par contre, les différences portent sur l'identité des canaux impliqués et les cinétiques associées, ainsi, naturellement, que sur le rôle physiologique du processus de propagation : déclenchement de la contraction mécanique pour le muscle, traitement et transmission de l'information pour le neurone.

Qu'il s'agisse de fibres musculaires (lisses, striées, cardiaques) ou de prolongements neuritiques, la présence de canaux ioniques se traduit par une modification de l'équation du câble de manière à introduire les courants engendrés par l'ouverture de ceux-ci. L'équation initiale (1) devient alors :

$$\frac{D}{4}\frac{1}{r_a}\frac{\partial^2 V}{\partial x^2} - c_m\frac{\partial V}{\partial t} - I_{HH} = 0 \qquad (2)$$

où I_{HH} représente les courants membranaires dus à la présence des canaux. Cette équation caractérise le mode de propagation régénératif. L'indice HH rappelle le travail fondateur de HODGKIN et HUXLEY qui élucidèrent ces mécanismes à la fin des années 1940. Ils proposèrent alors un formalisme qui reste un très bon modèle des courants dépendants du voltage. Selon ce formalisme (voir aussi chapitre VIII, § 2) :

$$I_{HH} = \sum_i g_i m_i^p h_i^q (V - V_i)$$

où : i désigne l'ion dont les déplacements contribuent au courant total $\sum_i$,

g_i est la conductance maximale associée au canal considéré. Elle est fonction de la conductance maximale des canaux individuels et de leur densité,

m_i et h_i sont respectivement les variables d'activation et d'inactivation,

p et q désignent des nombres entiers qui caractérisent d'un point de vue phénoménologique la structure du canal considéré (voir chapitre VIII, § 2).

V_i désigne le potentiel d'équilibre de l'ion concerné.

Nous renvoyons le lecteur au chapitre VIII où la signification et le rôle de m_i et h_i vis-à-vis du courant engendré par l'ouverture du canal concerné ont été détaillés.

Les neurones se caractérisent par une très grande diversité de canaux, diversité qui se manifeste surtout au niveau des dendrites et du corps cellulaire. Les types de canaux trouvés sur les axones sont bien moins nombreux, mais les canaux impliqués y sont présents à de très fortes densités, en particulier les canaux sodiques. C'est sur les prolongements axonaux que l'excitabilité de la membrane se manifeste de la manière la plus évidente.

A ce niveau axonal, les canaux permettent une propagation non-atténuée des variations de potentiel trans-membranaire et par conséquent la transmission rapide de signaux sur des distances qui peuvent être longues (voir § 2.1). Ces variations sont des potentiels d'action qui naissent à la partie initiale de l'axone (à proximité du soma). Les canaux responsables du phénomène sont très semblables à ceux décrits dans les travaux initiaux de HODGKIN et HUXLEY (voir chapitre VIII), à savoir des canaux sodiques à ouverture rapide, qui sont particulièrement denses dans la membrane axonale, et des canaux potassiques, dits de **rectification retardée**.

Les canaux sodiques se distribuent soit de manière continue, soit lorsque l'axone est pourvu d'une gaine de **myéline**, en agrégats situés au niveau des **nœuds de RANVIER** (voir § 2.1.1). Toujours au niveau de l'axone et de ses extrémités, un potentiel d'action (PA) ne dépend que des propriétés de la fibre, et tout particulièrement de la densité et de la nature des canaux. Une conséquence cruciale de cette propriété est que deux PA ne sont pas distinguables l'un de l'autre : c'est l'organisation temporelle des PA, souvent réunis en trains d'ondes, qui est porteuse d'information (figure 4b). Les paramètres pertinents de cette organisation temporelle (fréquence moyenne, instants précis de génération des PA par exemple) font toujours l'objet de débats dont l'enjeu est très important car ils concernent directement la manière dont l'information est codée dans le système nerveux.

Cette organisation temporelle des PA dépend notamment de la composition en canaux dépendant du voltage de l'ensemble somato-dendritique. Nous avons déjà souligné que les canaux dendritiques et somatiques voltage-dépendants sont d'une plus grande diversité que ceux portés par l'axone. Leurs différences de répartition d'un neurone à un autre et sur les dendrites d'une même cellule nerveuse sont encore très imparfaitement connues, de même que les conséquences physiologiques de leur présence. Il en sera à nouveau question dans le passage consacré aux effets des communications entre neurones, mais un point important peut déjà être mentionné : à la différence de ce qui se passe au niveau de l'axone, les courants engendrés par l'ouverture des canaux dendritiques ne déclenchent pas nécessairement des potentiels d'action sur les dendrites, bien qu'ils affectent la propagation des variations de potentiel trans-membranaire sur ces structures.

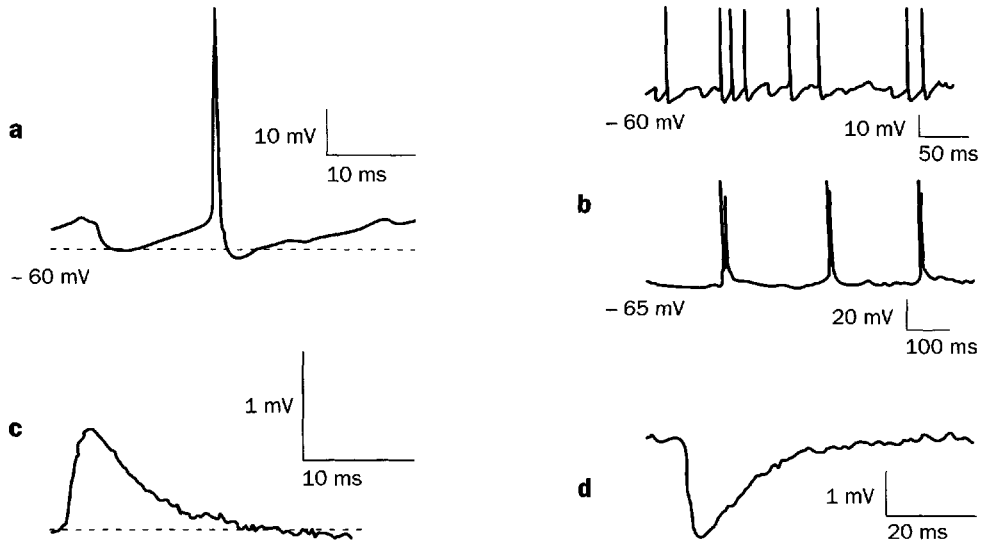


Figure 4 - Principaux évènements électrophysiologiques
a - potentiel d'action enregistré dans un neurone pallidal de rat (d'après LAVIN & GRACE, 1996)
b - deux modes d'émission différents des PA enregistrés au niveau de la même structure (d'après LAVIN & GRACE, 1996)
c - potentiel post-synaptique excitateur enregistré au niveau d'un neurone cortical (d'après THOMSON *et al.*, 1988)
d - potentiel post-synaptique inhibiteur enregistré au niveau d'un neurone hippocampal (d'après MILES & WONG, 1984)

3. *COMMUNICATIONS ENTRE NEURONES*

L'immense majorité des communications entre neurones semble de nature chimique, bien que des communications électriques soient également connues. Pour cette raison, c'est uniquement de la forme chimique des relations inter-neuronales qu'il sera question ici.

Ces communications se font, on l'a dit, au niveau de zones de contact appelées synapses.

3.1. SYNAPSES ET FONCTIONNEMENT SYNAPTIQUE

3.1.1. Position et morphologie des synapses

Le terme synapse désigne toute la zone mettant en relation deux neurones. Elle comprend donc une région pré-synaptique qui contient les neurotransmetteurs et une région post-synaptique, qui appartient au neurone cible. L'élément pré-synaptique se caractérise par un renflement. Un tel renflement est toujours présent à l'extrémité terminale de l'axone ou d'une branche axonale. Il prend alors le nom

de bouton synaptique (figure 5a). Mais on peut également observer ces renflements le long du trajet axonal, où ils sont appelés **varicosités**. Qu'il s'agisse d'un bouton ou d'une varicosité, l'élément pré-synaptique contient un grand nombre de structures vésiculaires, les vésicules synaptiques, à l'intérieur desquelles le neurotransmetteur est fortement concentré. Les vésicules sont formées à partir de la membrane du neurone et ont un diamètre allant de 30 à 150 nm.

L'élément post-synaptique est repérable par la présence d'une densification de la membrane cellulaire dans la zone synaptique. La membrane pré-synaptique présente parfois, elle aussi, un épaississement. Cette éventualité est à la base de la classification morphologique des synapses en deux groupes :

- ✓ les synapses asymétriques, où seul existe l'épaississement membranaire post-synaptique,
- ✓ les synapses symétriques, pour lesquelles la membrane pré-synaptique est également épaissie.

Un intérêt de cette subdivision réside dans la corrélation fonctionnelle qui lui est associée : les synapses asymétriques sont souvent excitatrices et les symétriques souvent inhibitrices. Cette opposition ne doit pas être considérée comme une règle absolue (notamment pour les synapses symétriques), mais comme une indication importante fournie par la morphologie à elle seule.

Eléments pré- et post-synaptiques sont séparés par l'espace synaptique, dont l'étendue va de 25 à 50 nm, alors que la surface de contact entre les deux éléments est d'environ 1 μm^2.

Certaines terminaisons, et surtout certaines varicosités, ne sont pas en contact étroit avec un élément post-synaptique identifiable. Celà se voit surtout dans l'innervation de certains organes comme les vaisseaux sanguins, mais aussi dans le système nerveux central. On ne peut plus alors parler de synapses au sens strict, mais le transmetteur libéré par l'axone n'en agira pas moins sur une (ou plusieurs) cellule(s) cible(s), qu'il atteindra après avoir diffusé à partir de son site de libération.

3.1.2. Les différentes familles de neurotransmetteurs

La très grande majorité des cellules nerveuses contient et utilise plusieurs espèces moléculaires neurotransmettrices différentes (voir encadré).

Pour qu'un neurone puisse utiliser un neurotransmetteur, il faut qu'il dispose de la machinerie de synthèse spécifique de ce composé. Cette machinerie est constituée d'enzymes. Selon l'origine du substrat de ces enzymes deux cas peuvent se présenter. Dans le premier cas la source du substrat est extérieure au neurone (c'est alors généralement l'un des **acides aminés** apportés à la cellule). L'identité neurochimique du neurone lui est alors conférée par le ou les gènes dont l'expression se traduit par la synthèse des enzymes agissant sur le substrat, puis ses dérivés[6]. Dans

6. On peut rattacher à ce cas celui du glutamate et de la glycine, qui sont des acides aminés utilisés comme neurotransmetteurs par de très nombreux neurones. Ces substances font aussi partie des

l'autre cas le substrat est endogène : c'est une protéine, ou un fragment protéique synthétisé par la cellule. Comme précédemment, des enzymes spécifiques vont transformer ce précurseur (par des clivages par exemple) pour aboutir au transmetteur lui-même (qui sera alors un peptide). Deux familles de gènes devront donc être exprimées, celle responsable de la synthèse du précurseur s'ajoutant à celle qui commande la synthèse des enzymes transformant celui-ci.

Neurotransmetteurs et neurotransmission

Les neurones synthétisent et libèrent une grande variété de substances capables d'agir sur d'autres cellules (qui sont dans l'immense majorité des cas d'autres neurones, mais parfois aussi des cellules musculaires ou sécrétrices). Ces actions sont également d'une très grande diversité. On se limite ici aux substances intra-vésiculaires libérées au niveau des boutons synaptiques et des varicosités et ayant des effets physiologiques à court terme sur le traitement de l'information nerveuse (par opposition, par exemple, à des agents actifs sur la croissance ou l'entretien cellulaire).

Ces substances vésiculaires forment à leur tour un groupe très vaste dans lequel on distingue souvent deux grandes classes, les neuromédiateurs et les neuromodulateurs. Le principal critère séparant ces deux groupes est le type d'action sur le potentiel de membrane de la cellule cible : un neuromédiateur modifie directement ce potentiel alors que le neuromodulateur ne l'affecte pas, mais modifie ses éventuelles variations en réponse à l'action d'autres agents. Nous choisissons ici de parler indistinctement de neurotransmetteurs, car :

- la distinction qui vient d'être mentionnée n'est pertinente que si l'on considère les actions produites et non pas les agents eux-mêmes. Ainsi une espèce moléculaire donnée pourra induire une variation de potentiel de membrane au niveau de la cellule cible dans certaines conditions et pas dans d'autres. De plus, un même agent pourra avoir des effets de natures différentes selon l'identité de la cellule cible, et même selon la région de celle-ci où il agit,
- même dans le seul cadre des actions neuromédiatrices, une même espèce moléculaire aura souvent des effets variés.

Les raisons principales de cette diversité tiennent aux fait que

- un même agent peut être libéré de différentes manières selon le type de neurone qui le porte, et surtout
- que son action dépend crucialement de sa fixation à une molécule spécifique complémentaire portée par la cellule cible.

Cette molécule est un récepteur de l'agent de transmission, et les principaux neuromédiateurs et neuromodulateurs possèdent chacun plusieurs types de récepteurs spécifiques différant considérablement entre eux du point de vue de leur effet sur la cellule porteuse cible. Nous appellerons donc neurotransmetteurs (le terme est parfois permuté avec celui de neuromédiateur) tous les agents de communication intercellulaire stockés dans les vésicules et libérés lorsque le neurone est actif.

Cette machinerie de synthèse est acquise lors de la différenciation chimique du neurone, laquelle est indépendante de sa différenciation morphologique.

---

acides aminés constitutifs des protéines de l'organisme et à ce titre elles sont délivrées à toutes les cellules. Ce qui caractérise sur le plan neurochimique les neurones où ces acides aminés sont aussi des neurotransmetteurs n'est donc pas une enzyme apte à les transformer, mais une protéine membranaire qui est un transporteur spécifique du transmetteur. Ce transporteur concentre fortement l'acide aminé correspondant au niveau des boutons synaptiques ; l'identité neurochimique est en ce cas liée à l'expression du gène responsable de la synthèse du transporteur.

Alors que chaque cellule nerveuse possède plusieurs transmetteurs, ces derniers sont présents au niveau de toutes les synapses formées par le neurone. Il n'existe pas de ségrégation intra-cellulaire par laquelle certaines terminaisons libéreraient l'un des neurotransmetteurs et pas un autre.

Chimiquement, les neurotransmetteurs se répartissent en quelques grandes familles, dont les représentants principaux sont indiqués dans le tableau 1.

Tableau 1 - Principales familles de neurotransmetteurs

ACIDES AMINÉS	MONOAMINES		PEPTIDES	
	Catécholamines	**Indolamines**	**Opioïdes**	**Tachykinines**
glutamate GABA glycine	dopamine noradrénaline adrénaline	sérotonine	β-endorphines enképhalines	substance P

Dans chaque famille, les représentants les mieux connus sont indiqués. Glutamate et glycine sont des acides aminés constitutifs des protéines. Les catécholamines appartiennent à la même chaîne de synthèse et dérivent donc les unes des autres. Les peptides sont de courtes chaînes d'acides aminés. GABA = acide γ-amino-butyrique. Le glutamate est le plus répandu des neurotransmetteurs excitateurs, tandis que le GABA est le plus répandu des transmetteurs inhibiteurs. La glycine est également un inhibiteur. L'acétylcholine est un neurotransmetteur répandu qui n'appartient pas à l'un de ces grands groupes.

Cette liste n'est sans doute pas close et nous n'en faisons ici qu'une brève présentation. Elle comporte trois familles, ce qui correspond plus aux nombreuses données physiologiques concernant les systèmes neuronaux où l'on trouve les membres de ces familles et aux particularités de leurs métabolismes qu'à une subdivision purement chimique. En effet, du seul point de vue de la chimie il n'y aurait en fait que deux groupes, celui des petites molécules (**acides aminés** et monoamines) et celui des peptides, qui sont des molécules de plus grande taille.

Les neurotransmetteurs utilisés par un même neurone appartiennent souvent à des familles différentes.

Ce qui distingue le plus profondément ces grands groupes de neurotransmetteurs ce sont en fait leurs modalités d'action.

Ces modes d'action différents, qui recouvrent en partie les distinctions entre neuromédiateurs et neuromodulateurs (voir encadré), se répartissent selon 3 grands axes :

✓ une dimension spatiale, à savoir le rayon d'action du transmetteur. Pour certaines substances, en particulier les acides aminés, ce rayon est très réduit, limité pratiquement à l'espace synaptique. Dans ce cas, la communication intercellulaire peut être considérée comme ponctuelle. Pour d'autres agents, notamment les **peptides**, mais parfois aussi les **monoamines**, le rayon est beaucoup plus étendu, le transmetteur diffusant à distance de la synapse qui le libère. Entrent dans ce groupe les cas où il n'y a pas d'élément post-synaptique identifiable au contact du site de libération (voir § 3.1.1.). Des distances de plusieurs dizaines, voire centaines de microns ont été avancées pour de telles

diffusions, mais l'on manque encore de données précises malgré quelques travaux consacrés à cette très importante question qui reste ouverte [7]. Le rayon d'action dépend théoriquement de la quantité de transmetteur libérée, des processus de dégradation des molécules émises, des processus de recaptage par les cellules avoisinantes, de la géométrie du milieu extra-cellulaire et la part de ces différents facteurs varie d'un système à un autre,

- ✓ une dimension temporelle, le long de laquelle de grands écarts s'observent à nouveau. L'effet des transmetteurs va en effet de la plus grande brièveté (quelques millisecondes) à plusieurs centaines de millisecondes pour certains peptides. Ici, le type de récepteur par lequel agit le transmetteur joue un rôle essentiel. Là encore, les actions les plus brèves sont le fait des acides aminés, les plus longues revenant aux peptides,
- ✓ une dimension qualitative, selon que l'effet premier du transmetteur modifie ou non le potentiel de membrane de la cellule cible (voir encadré), la modification consistant en une dépolarisation ou au contraire une hyperpolarisation. La sélection entre ces différentes éventualités dépend à nouveau du type de récepteur fixant le transmetteur et aussi de l'état de la cellule cible au moment de la transmission. Ainsi le GABA (acide gamma-amino-butyrique) peut être hyperpolarisant (le plus souvent), mais aussi dépolarisant lorque le potentiel membranaire du neurone cible est inférieur à – 70mv.

Le mode « classique » de neurotransmission combine une action très localisée dans l'espace (restreinte au site synaptique) et dans le temps, et consiste en une dépolarisation ou hyperpolarisation de l'élément post-synaptique. Le seul neurotransmetteur qui, pour l'instant, semble n'avoir que ce mode d'action est la glycine, qui est un acide aminé inhibiteur (voir tableau 1).

Ces modalités d'action différentes entre familles de neurotransmetteurs offrent une interprétation très satisfaisante de la diversité des transmetteurs présents au sein d'un même neurone. On observe par exemple très souvent la co-localisation d'un peptide et d'un acide aminé. Lors de la libération conjointe de ces deux composés, le neurone aura donc au moins deux modes d'action distincts sur ses cibles. Dans certains systèmes neuronaux, des observations commencent d'ailleurs à montrer que la part relative de ces différentes actions peut varier en fonction de l'état d'activité des neurones émetteurs.

3.1.3. Processus de libération et récepteurs des neurotransmetteurs

Les très nombreux neurotransmetteurs mis en évidence en neurophysiologie et en neuropharmacologie ont des actions qui s'exercent soit pré-synaptiquement, soit post-synaptiquement, certains ayant une double action pré- et post-synaptique.

Le processus de libération classiquement admis se décrit schématiquement de la manière suivante (figure 5).

---

7. Voir par exemple C. NICHOLSON & E. SYKOVA - Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *TINS* **21**, 207-215 (1998).

La dépolarisation qui survient lorsque le PA envahit la membrane pré-synaptique provoque une entrée de calcium. Celle-ci déclenche une série de phénomènes qui aboutissent à la fusion d'un certain nombre de vésicules synaptiques avec la membrane cellulaire, provoquant ainsi la libération du contenu vésiculaire dans l'espace synaptique.

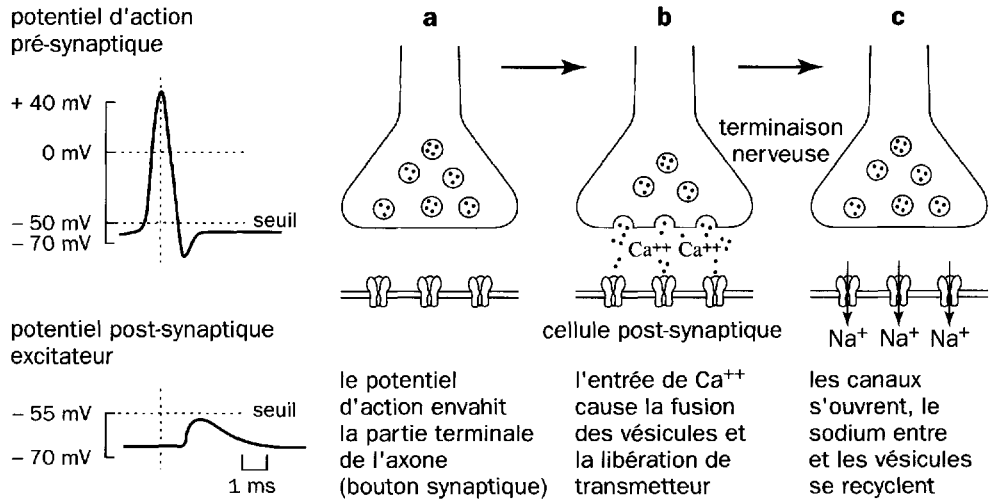


Figure 5 - Représentation schématique des principaux évènements de la transmission synaptique de l'information
(d'après JESSEL & KANDELL, 1993, avec l'autorisation d'Elsevier)
Les évènements et structures pré-synaptiques sont figurés à la partie supérieure, leurs répondants post-synaptiques à la partie inférieure.

Le nombre de vésicules dont le contenu est ainsi déversé dans l'espace synaptique peut être élevé (plusieurs centaines dans le cas de la jonction nerf-muscle) mais semble limité à un pour les sites de libération (boutons synaptiques et varicosités axonales) du système nerveux central.

La libération est variable d'un influx à l'autre car :

- ✓ le PA peut ne pas produire d'effet sur la terminaison ou la varicosité. A chaque synapse est ainsi associée une probabilité de libération. Un échec dans la libération au niveau d'une synapse ne signifie pourtant pas que la fibre parcourue par le PA soit sans action sur le neurone post-synaptique car un axone forme généralement plusieurs synapses avec une même cellule cible,
- ✓ la quantité de neurotransmetteur émise en un site de libération peut varier elle aussi d'un PA à l'autre. En outre, la cinétique exacte du processus de libération pour un transmetteur donné dépend du type de neurone.

Pour qu'il y ait réellement transmission, la libération doit s'accompagner d'une fixation des molécules libérées sur des sites récepteurs spécifiques.

3.1.4. Fixation aux récepteurs

Spécificité de la fixation

Comme nous l'avons souligné, à chaque neurotransmetteur correspond une, ou plus souvent plusieurs, espèces moléculaires capables de le lier de façon réversible et avec une forte affinité. La liaison se fait au niveau d'un site particulier de la molécule réceptrice. C'est de cette liaison que vont découler les actions du transmetteur sur sa cellule cible.

Ces récepteurs sont des protéines membranaires, le site de fixation étant accessible sur la face externe de la membrane. Certaines de ces molécules commencent à être connues avec une grande précision, notamment grâce aux techniques de la biologie moléculaire.

La spécificité de l'interaction neurotransmetteur/récepteur dépend de l'affinité du premier pour son site récepteur. On définit ainsi pour chaque récepteur un profil d'affinité faisant apparaître une affinité maximale pour un neurotransmetteur et des affinités plus faibles pour d'autres transmetteurs, généralement de la même famille.

La fixation à un récepteur est une propriété essentielle utilisée en pharmacologie à des fins thérapeutiques. Les pharmacologues mettent ainsi continuellement au point des substances exogènes à très haute affinité pour un type de récepteur donné. L'affinité de ces composés pour le récepteur correspondant est bien plus élevée que celle du neurotransmetteur naturel, si bien que leur administration interfère puissamment avec les transmissions synaptiques mettant physiologiquement en jeu le transmetteur.

Quelques caractéristiques des récepteurs aux neurotransmetteurs

Comme on l'a évoqué plus haut (voir encadré *Neurotransmetteurs et neurotransmission*), les propriétés fonctionnelles des récepteurs sont d'une importance capitale car ce sont elles qui déterminent pour une large part l'effet d'un neurotransmetteur sur une cellule donnée. En effet, les différents types de récepteurs spécifiques d'un neurotransmetteur donné peuvent avoir des actions très dissemblables sur les cellules qui les portent. On connaît ainsi trois types de récepteurs au glutamate dont les actions diffèrent fortement. De même le GABA possède au moins deux grands types de récepteurs dont les effets diffèrent considérablement par leurs conditions de survenue et leurs constantes de temps (voir annexe).

De manière plus générale, les récepteurs forment deux grandes familles, les récepteurs ionotropes et les récepteurs métabotropes (figure 6). Les **récepteurs ionotropes** sont des canaux ioniques trans-membranaires pourvus d'un site récepteur (figure 6a). La fixation spécifique du neurotransmetteur correspondant induit l'ouverture transitoire du canal, et par suite une modification du potentiel trans-membranaire à ce niveau. Ces canaux diffèrent donc des canaux dépendants du voltage en ce que leur ouverture est provoquée par la fixation d'un agent moléculaire (le ligand) et non par une variation du potentiel de membrane. En ce qui concerne les **récepteurs métabotropes**, la fixation du neurotransmetteur n'a au

contraire pas d'effet électrique par elle-même. Cette fixation déclenche dans le cytoplasme proche du récepteur une cascade de réactions métaboliques dont les effets sont très variés selon le type de récepteur et le neurone qui le porte (figure 6b). Plusieurs chaînes de réactions peuvent s'observer à partir de l'activation d'un même récepteur. Certaines des réactions initiées peuvent aboutir à l'ouverture ou la fermeture de canaux, créant ou supprimant un flux ionique, d'où une modification secondaire du potentiel de membrane. Souvent, ces actions métaboliques se traduisent par un changement au niveau de canaux dépendants du voltage, ce qui altère la réactivité électrique du neurone concerné. Généralement ce changement ne se manifestera que si le neurone est dépolarisé ou hyperpolarisé à partir d'une autre source. Les récepteurs métabotropes sont ainsi les intermédiaires principaux des effets neuromodulateurs des transmetteurs.

Pour un neurone donné, à la variété des neurotransmetteurs libérés s'ajoute donc la diversité des récepteurs spécifiques à chaque neurotransmetteur. Cette forme de diversité est en outre plus large, car elle a un caractère spatial. En effet, alors que toutes les terminaisons du même axone libèrent les mêmes transmetteurs, les récepteurs correspondants, eux, ne sont pas distribués de manière identique dans l'ensemble des synapses concernées.

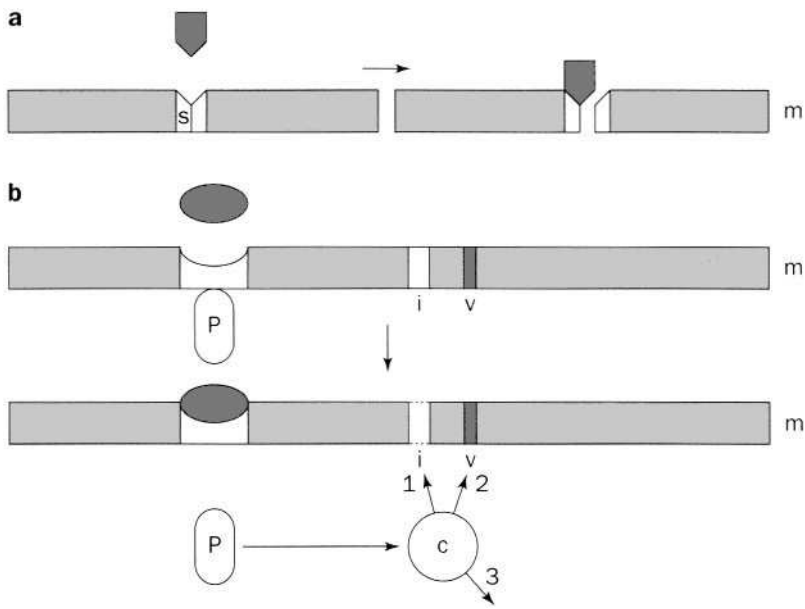


Figure 6 - Représentation très schématique des deux grands types de récepteurs neurotransmetteurs

a – récepteur ionotrope. Le récepteur est un canal ionique portant un site de fixation (s) spécifique du transmetteur (symbole grisé). La liaison du transmetteur à son site induit l'ouverture transitoire du canal.

b – récepteur métabotrope. La fixation du neurotransmetteur (symbole grisé) à son récepteur induit, par l'intermédiaire de protéines (P) liées à la membrane, le déclenchement d'une cascade de réactions (c) pouvant aboutir à l'ouverture de canaux ioniques (i), la modulation des propriétés des canaux dépendant du voltage (v), d'autres effets (métaboliques, génomiques).

3.2. CONSÉQUENCES DE LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE

On ne va parler ici que des conséquences électriques immédiatement manifestes de la neurotransmission. Les autres actions concernent en effet la réactivité, à court ou long terme, du neurone post-synaptique à ces évènements électriques ; quand elles ont lieu, elles sont donc « incorporées » dans les phénomènes électriques dont il va être question maintenant.

3.2.1. Potentiels post-synaptiques

L'ouverture des canaux associés aux récepteurs ionotropes est transitoire ; il en est de même pour l'ouverture des canaux qui sont la cible de réactions initiées par l'activation des récepteurs métabotropes (premier cas de la figure 6b). Les ions qui franchissent la membrane par ce biais sont à l'origine d'un courant qui modifie également transitoirement le potentiel trans-membranaire au niveau de la région synaptique. Cette modification est appelée potentiel post-synaptique (PPS). Selon l'identité du ou des ions responsables, la modification est soit une dépolarisation (figure 4c), soit une hyperpolarisation (figure 4d). Dans le premier cas, le potentiel est qualifié de potentiel post-synaptique excitateur (PPSE), dans le second il est appelé potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI).

L'amplitude et l'évolution temporelle du potentiel post-synaptique dépendent du type de canal responsable et de la géométrie du neurone dans la région synaptique. Le courant synaptique qui le provoque est décrit par la relation :

$$I_{syn} = g_{syn}(V - V_{syn}) \tag{3}$$

où V est le potentiel de membrane dans la zone portant la synapse, V_{syn} étant le potentiel d'équilibre du ou des ions impliqués. La conductance synaptique g_{syn} se représente avec une bonne approximation par :

$$g_{syn} = G_{max} \frac{t}{\tau_p} e^{1-\frac{t}{\tau_p}} \tag{4}$$

G_{max} étant la conductance synaptique maximale (généralement exprimée en nanosiemens), t le temps en ms. Le paramètre τ_p définit le temps de survenue du pic de courant et caractérise le décours temporel du PPS local *via* la variation de la conductance.

Fonctionnellement, le PPS constitue la manifestation de la survenue d'un PA au niveau pré-synaptique. Il représente donc l'unité d'information reçue par le neurone. Ainsi, le traitement de l'information par le neurone, processus appelé habituellement intégration en neurophysiologie, s'identifie essentiellement au devenir des PPS sur le neurone post-synaptique. Les facteurs régissant ce devenir sont par conséquent de la plus extrême importance.

3.2.2. Intégration dendritique des informations reçues par le neurone

90% des synapses étant portées par les dendrites, c'est essentiellement sur ces derniers que les PPS surviennent. C'est pour cette raison que nous avons qualifié plus haut les dendrites de zone de réception et de traitement de l'information.

Nous avons également indiqué (§ 2.2.2) que pendant longtemps la propagation dendritique des PPS avait été considérée comme purement **électrotonique**. En fait, on sait maintenant que la présence dans la membrane dendritique de canaux ioniques dépendants du voltage introduit des variations par rapport à ce mode de propagation exclusivement passif. Toutefois, celui-ci reste le cadre de référence pour l'interprétation des phénomènes d'intégration dendritique. Il a de plus été très bien étudié du point de vue théorique [8].

Intégration en mode passif

En mode de propagation passif, l'intégration dendritique est régie par les principes qui ont été présentés ci-dessus (voir § 2.2.1). Elle dépend complètement de la structure électrotonique du neurone et la géométrie dendritique y joue par conséquent un rôle capital. Sans détailler plus avant ces phénomènes, nous n'en retiendrons ici que les principales conséquences fonctionnelles :

- ✓ plus une synapse est éloignée du corps cellulaire, plus l'effet lié à son activation sera réduit. Cependant, la relation entre l'effet au niveau du soma et la position de la synapse sur l'arbre dendritique dépend là encore fortement de la géométrie de celui-ci,
- ✓ plusieurs PPS survenant au même moment ajoutent leurs effets. C'est ce qu'on désigne par l'expression de sommation temporelle, phénomène qui est en fait à la base de l'intégration des informations reçues par le neurone,
- ✓ lorsque les PPS qui se combinent ainsi sont engendrés par des synapses différentes, on utilise l'expression de sommation spatiale, bien que celle-ci soit nécessairement aussi une sommation temporelle.

Physiologiquement, la sommation spatiale joue un rôle prépondérant dans l'intégration dendritique des informations car la quantité de synapses portées par le dendrite est considérable, alors que les effets individuels de ces synapses sont faibles. Dans toutes les situations où le neurone est mis en jeu, une fraction appréciable de ces synapses est activée et la variation de potentiel trans-membranaire est le résultat de la sommation spatiale des effets (les PPS) de ces activations. Des compétitions entre effets dépolarisants et hyperpolarisants sont rendues possibles par ces combinaisons. Selon la distance séparant les synapses activées, la sommation est parfaitement linéaire si les synapses sont suffisamment éloignées pour que le potentiel membranaire au niveau de chacune d'elle ne soit pas affecté par les

8. Voir par exemple H. AGMON-SNIR - A novel theoretical approach to the analysis of dendritic transients. *Biophysical Journal* **69**, 1633-1656 (1995) ; I. SEGEV & M. LONDON - A theoretical view of passive and active dendrites. *In :* G. STUART, N. SPRUSTON & M. HÄUSSER - *Dendrites*. Oxford Univ. Press, 205-230 (1999).

PPS survenant sur les autres synapses. Un tel isolement électrique est très favorisé par les branchements dendritiques. Dans le cas contraire, la sommation présente des effets de saturation et donc une déviation par rapport à la linéarité qui provient d'une réduction de la force électromotrice $V - V_{syn}$ [éq. (3)].

En résumé, les PPS résultant des activations synaptiques sont à la fois propagés et sommés dans une fenêtre temporelle dépendant de leur durée. Celle-ci résulte à son tour de la cinétique du courant induit par l'activation des récepteurs correspondants et, à distance de la synapse, de la constante de temps membranaire. Ces sommations et propagations se traduisent par des fluctuations du potentiel trans-membranaire du soma et de la portion initiale de l'axone. Chaque fois que ces fluctuations portent le potentiel de membrane de ces régions au niveau du seuil d'excitation, un potentiel d'action est émis et parcourra l'axone jusqu'à ses extrémités. Dans cette conception, le potentiel trans-membranaire du soma dépend essentiellement des évènements électrophysiologiques se déroulant au niveau des dendrites (les synapses portées par le corps cellulaire lui-même sont très efficaces, mais peu nombreuses) et on a longtemps considéré qu'il existait un sens unique de circulation de l'information, des dendrites vers le soma, puis de celui-ci vers les extrémités axonales. Toujours selon cette conception, l'émission éventuelle de PA est la conséquence occasionnelle de la combinaison des PPS sur les dendrites. Ce schéma se complique lorsque la membrane dendritique contient elle aussi des canaux dépendants du voltage.

Intégration en mode régénératif

Les données relatives à la présence de canaux dépendants du voltage au niveau des membranes dendritiques sont encore très fragmentaires. L'identité de ces canaux et leur distribution sur les arbres dendritiques varient considérablement d'une population neuronale à une autre, si bien que l'on peut difficilement généraliser les indications fournies par l'étude, techniquement toujours difficile, d'un type cellulaire particulier. La présence de tels canaux introduit donc une importante diversité supplémentaire dans le fonctionnement neuronal, diversité qui vient se superposer à celle due à la géométrie dendritique. Par exemple, l'atténuation de la propagation en direction du soma des PPS excitateurs sera limitée ou au contraire majorée en fonction de la présence de canaux sodiques ou potassiques sur les dendrites concernés. Il en va de même pour le phénomène de sommation, également affecté par l'existence ou l'absence de ces canaux.

Quelques résultats remarquables ont été obtenus avec des types neuronaux possédant des canaux sodiques sur leurs dendrites :

- ✓ l'initiation de PA au niveau du dendrite lui-même est peu fréquente,
- ✓ l'initiation se fait donc le plus souvent, conformément à la conception classique, au niveau de la portion initiale de l'axone. Toutefois, les PA engendrés dans cette région « remontent » le long des dendrites tant que les branches de ceux-ci contiennent suffisamment de canaux sodiques, ce qui correspond parfois à la totalité de l'arbre dendritique. Il existe donc pour certains types de neurones une

rétropropagation des PA, phénomène très nouveau qui représente un mode de circulation de l'information du soma vers les dendrites (et en particulier vers les sites synaptiques) contraire au principe traditionnel qui stipulait que les informations sont acheminées de manière toujours unidirectionnelle des synapses vers le corps cellulaire.

Dans le schéma qui prévaut actuellement, c'est donc toujours au niveau du soma, ou plus vraisemblablement de la portion initiale de l'axone, que des PA sont initiés. Mais les conductances dépendantes du voltage viennent complexifier le traitement dendritique de l'information en :

- ✓ modifiant l'atténuation des PPS sur leur chemin vers le soma (par exemple en facilitant cette propagation ou au contraire en la restreignant),
- ✓ affectant les interactions entre PPS (par exemple en diminuant la fenêtre temporelle de sommation ou encore en linéarisant leur sommation),
- ✓ permettant la rétropropagation des PA sur les dendrites.

La signification fonctionnelle de la nouvelle organisation qui commence ainsi à être mise à jour reste largement à établir, sachant qu'elle diffère très certainement d'un type de neurone à un autre, notamment selon l'identité des canaux impliqués. On peut néanmoins en tirer déjà une conséquence importante et de portée très générale : les propriétés fonctionnelles distinctives d'un type neuronal (neurones moteurs, **cellules de PURKINJE**, cellules pyramidales du cortex cérébral par exemple) sont le produit des particularités de deux ensembles de paramètres, la structure électrotonique (en particulier la géométrie dendritique) et l'équipement somato-dendritique en canaux ioniques dépendants du voltage. Une partie importante des effets de la neurotransmission (voir encadré *Neurotransmission*) autres que la génèse de potentiels d'action se fait à ce niveau, par modulation transitoire des propriétés des conductances impliquées (figure 6b, en bas).

Une retombée fréquemment envisagée de ce comportement dendritique plus complexe est l'influence que ces phénomènes pourraient avoir sur l'efficacité des synapses. Cela nous conduit à évoquer maintenant un aspect très important des communications entre neurones, la plasticité synaptique.

3.2.3. Plasticité synaptique

L'image des intégrations dendritiques présentée jusqu'à présent est figée dans la mesure où les processus évoqués ne varient pas d'un moment à un autre. Plus précisément, les variations d'amplitude des PPS évoqués sur un neurone par l'activité d'un axone donné y sont conçues comme un processus indépendant du temps. Or, il est maintenant bien établi que ce n'est pas le cas : les transmissions synaptiques se modifient au cours du temps, notamment en fonction de l'histoire des synapses considérées. L'ensemble des phénomènes relatifs à ces modifications relève de ce qu'on appelle la plasticité synaptique.

L'étude de la plasticité synaptique est pour une large part celle des modifications de l'efficacité de la transmission synaptique, ou poids synaptique. Une bonne

mesure de cette efficacité est l'amplitude des PPS engendrés par l'activité des synapses considérées. Pour simplifier, on distingue des variations à court terme (souvent moins d'une seconde), rapidement réversibles, et des variations plus durables, dont on estime souvent qu'elles sont la base des processus d'apprentissage et de mémorisation.

Modifications à court terme

Dans de nombreux systèmes neuronaux, les PPS induits par un train de PA pré-synaptiques ne sont pas d'amplitude constante, mais augmentent ou diminuent d'une impulsion à la suivante. L'amplitude et le décours temporel d'un PPS est ainsi fonction de l'intervalle de temps séparant le PA qui lui donne naissance du PA précédent. L'une des causes probables de cette dépendance est que la survenue d'un PA au niveau d'une terminaison axonale modifie la probabilité de libération des neurotransmetteurs à cet endroit, le retour à la probabilité qui correspond au repos de la fibre nécessitant une inactivité prolongée (environ 1 s) de l'axone. Mais la probabilité de libération du transmetteur n'est sans doute pas seule en cause dans la mesure où des modifications d'amplitude des potentiels unitaires (c'est-à-dire des potentiels induits au niveau d'un seul site synaptique) ont également été observées.

Modifications à long terme

Des modifications durables de l'efficacité synaptique, susceptibles de laisser une trace persistante dans le fonctionnement de certains ensembles neuronaux, ont été postulées depuis longtemps [9]. La mise en évidence de telles modifications est plus récente, mais on dispose maintenant de plusieurs types de protocoles expérimentaux permettant d'en étudier diverses formes et de les caractériser.

La situation expérimentale la plus utilisée pour étudier ces changements est connue sous le nom de potentialisation à long terme (*long term potentiation* ou *LTP* en anglais [10]). Cette potentialisation est obtenue par l'activation soutenue et prolongée (plusieurs dizaines de minutes) de groupes de synapses bien identifiées. L'activation est réalisée par la stimulation électrique des fibres pré-synaptiques. Après un tel traitement, l'efficacité de certaines synapses, qui peuvent être en partie différentes de celles ayant subi la stimulation, est accrue pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours. Il existe d'autre part un phénomène symétrique, observable dans des conditions expérimentales très proches, la dépression à long terme (LTD). Ce phénomène peut être induit sur d'autres systèmes neuronaux, ou même parfois sur ceux présentant aussi une LTP : dans ce cas, le passage de la LTP à la LTD s'observe pour le changement de paramètres tels que l'intensité de stimulation.

---

9. Voir par exemple R.D. HAWKINS, E.R. KANDEL & S.A. SIEGELBAUM - Learning to modulate transmitters release: themes and variations in synaptic plasticity. *Ann. Rev. Neurosci.* **16**, 625-665 (1993).

10. J.L. MARTINEZ & B.E. DERRICK - Long-term potentiation and learning. *Ann. Rev. Psychology* **47**, 173-203 (1996).

Si l'étude de la LTP donne lieu en permanence à une très grande quantité de travaux [11] il existe, on l'a dit, d'autres modèles expérimentaux de modifications synaptiques prolongées. On est encore loin d'avoir une compréhension satisfaisante de tous ces processus et surtout de leur signification fonctionnelle précise. Mais leur existence rend plus que vraisemblables les hypothèses anciennes qui postulaient :

1. que la réorganisation des circuits nerveux par l'usage sous-tend les effets de l'expérience sur le comportement et sur les performances du système nerveux,
2. que cette réorganisation repose largement sur des modifications synaptiques durables.

Les synapses portées par les **épines dendritiques** semblent particulièrement bien placées pour être le siège de tels phénomènes [12]. En effet, l'induction des modifications synaptiques à long terme semble dépendre de l'entrée massive de calcium lors de la mise en jeu du phénomène au niveau des synapses concernées. Le lien entre l'activation dans des conditions particulières de ces synapses et le changement durable de leurs propriétés résiderait ainsi dans une élévation importante et transitoire de la concentration calcique intra-cytoplasmique au voisinage de ces synapses. Pour que seules les synapses impliquées soient modifiées (et non pas indistinctement toutes celles portées par la cellule) il faut que l'élévation de calcium intra-cellulaire reste très localisée. Or les épines dendritiques constituent de par leur géométrie une structure très favorable à une élévation à la fois très forte et spatialement restreinte de le concentration calcique intra-cellulaire.

D'autres hypothèses postulaient également que les performances du système nerveux, et en particulier les grandes fonctions de la neurophysiologie, sont en fait obtenues par l'action d'ensembles de neurones distribués dans les différents centres et circuits mis en évidence par la neuro-anatomie. Ceci va nous conduire à évoquer brièvement ces circuits pour terminer ce chapitre.

4. QUELQUES PROPRIÉTÉS DES ENSEMBLES DE NEURONES

4.1. FONCTIONNEMENT COLLECTIF DES GROUPES DE NEURONES

Le concept sous-jacent, suggéré par tout un ensemble d'observations classiques chez les vertébrés, postule que c'est l'action collective de groupes de neurones qui permet la réalisation des fonctions du système nerveux. Par action collective, on entend ici une ou des répartitions particulières d'activités au sein de populations neuronales et pas seulement l'addition non-organisée de ces activités. A titre

11. Pour une revue récente, voir S.P. MARTIN, P.D. GRIMWOOD & R.G.M. MORRIS - Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Ann. Rev. Neurosci.* **23**, 649-711 (2000).

12. Voir C. KOCH & A. ZADOR - The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J. Neuroci.* **13**, 413-422 (1993).

d'exemple simple, on peut remarquer que des neurones sensoriels isolés répondent souvent de manière peu reproductible à la présentation d'un même stimulus, alors que la reconnaissance de celui-ci, vérifiée directement pour un sujet humain ou à travers une réponse comportementale chez l'animal, est au contraire tout à fait reproductible. La fiabilité de la réponse perceptive et/ou comportementale semble donc reposer sur l'activité de groupes de neurones. Autre exemple : des arguments expérimentaux récents ont suggéré que certains paramètres du mouvement soient représentés par l'activité distribuée de grandes populations cellulaires du cortex cérébral. Par ailleurs, l'implication d'activités neuronales collectives précisément ordonnées dans la genèse de rythmes moteurs (respiration et locomotion par exemple) est clairement établie.

La recherche des mécanismes responsables de ces processus d'activité collective, mais aussi plus généralement l'interprétation physiologique d'une activité neuronale, conduisent nécessairement à l'étude des propriétés de connectivité au sein d'un ensemble de neurones.

4.2. FORMES ET RÔLES DE LA CONNECTIVITÉ NEURONALE

La connectivité neuronale tient une place essentielle en neurophysiologie et en neuropathologie (voir annexe).

En neurophysiologie, l'organisation de certains circuits neuronaux suggère depuis longtemps l'existence de fonctions associées : filtrage de signaux, genèse de rythmes, accentuation du contour des formes par exemple. Bien que de telles relations entre organisations micro-anatomiques et fonctions spécifiques soient souvent difficiles à établir, il paraît certain que la façon dont les neurones sont connectés entre eux détermine la fonction de l'ensemble.

Il est utile de distinguer deux types de connectivité : une connectivité longue et une connectivité courte.

4.3. CONNECTIVITÉ COURTE

La connectivité courte est celle qui met en relation les neurones d'un même centre. Elle revêt des formes très diverses selon les centres considérés (figure 7). Pour chacun de ceux-ci, l'organisation de la connectivité courte est une caractéristique topologique très importante qui détermine fortement les opérations réalisées par le centre. Elle se caractérise notamment par la forme des relations entre les neurones du centre considéré et par les types cellulaires qui matérialisent ces relations, la plupart des centres étant constitués de plusieurs populations neuronales. On pourra par exemple rencontrer des inhibitions entre proches voisins (inhibition latérale, figure 7c) fréquentes dans les systèmes sensoriels, ou des inhibitions exercées par un neurone sur celui ou ceux qui l'excitent (inhibition récurrente, figure 7b) que l'on trouve plutôt dans les centres moteurs. Ces relations très précisément

structurées sont plus ou moins complexes selon la diversité des interneurones mis en jeu. Elles se font dans un espace restreint à quelques centaines de microns au plus. Dans cet espace les connexions interneuronales forment ce qu'on appelle des circuits locaux où sont traitées les informations relayées par le centre considéré.

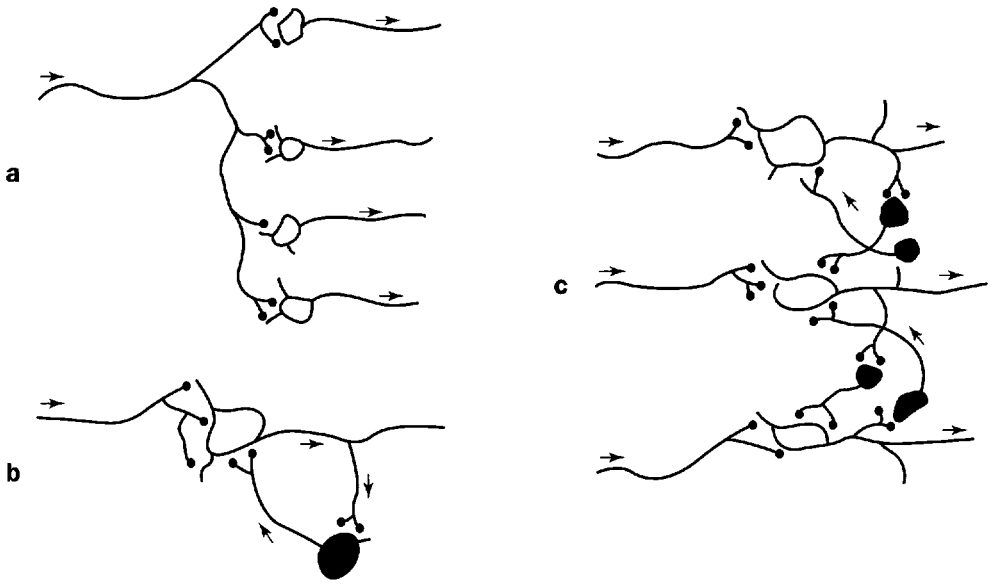


Figure 7 - Représentations schématiques de divers types d'arrangements neuronaux
Les neurones inhibiteurs sont colorés, les neurones excitateurs sont vides. Les flèches indiquent le sens de parcours des potentiels d'action.
a - diffusion par divergence ; **b** - circuit d'inhibition récurrente ; **c** - inhibition latérale des proches voisins.

En plus des exemples indiqués sur la figure 7, on citera encore celui des colonnes corticales (figure 8), qui sont des groupes de cellules du cortex cérébral interconnectées et dont on estime qu'elles représentent l'unité de traitement d'information pertinente en physiologie corticale [13].

D'autres exemples de connectivité courte sont bien documentés. Citons notamment le cas de la rétine, dont l'architecture cellulaire commence à être bien connue, ou encore celui des centres olfactifs [14].

13. Le cortex cérébral est un feuillet de substance grise qui recouvre toute la partie supérieure du cerveau. Il occupe donc une surface considérable chez l'homme et les espèces apparentées. Fonctionnellement, il est considéré comme le plus haut situé des centres nerveux. L'immense majorité des informations qui lui parviennent sont issues d'un très gros centre sous-jacent, le thalamus. Elles concernent non seulement toutes les modalités sensorielles (audition, vision, tact...) mais aussi les mouvements dans lesquels le corps est engagé ou va s'engager. Le cortex contrôle toutes les fonctions réalisées par le système nerveux et joue un rôle essentiel dans les tâches cognitives et les processus psychiques.

14. Voir par exemple R.H. MASLAND - The fundamental plan of the retina. *Nature Neuroscience* **4**, 877-886 (2001).

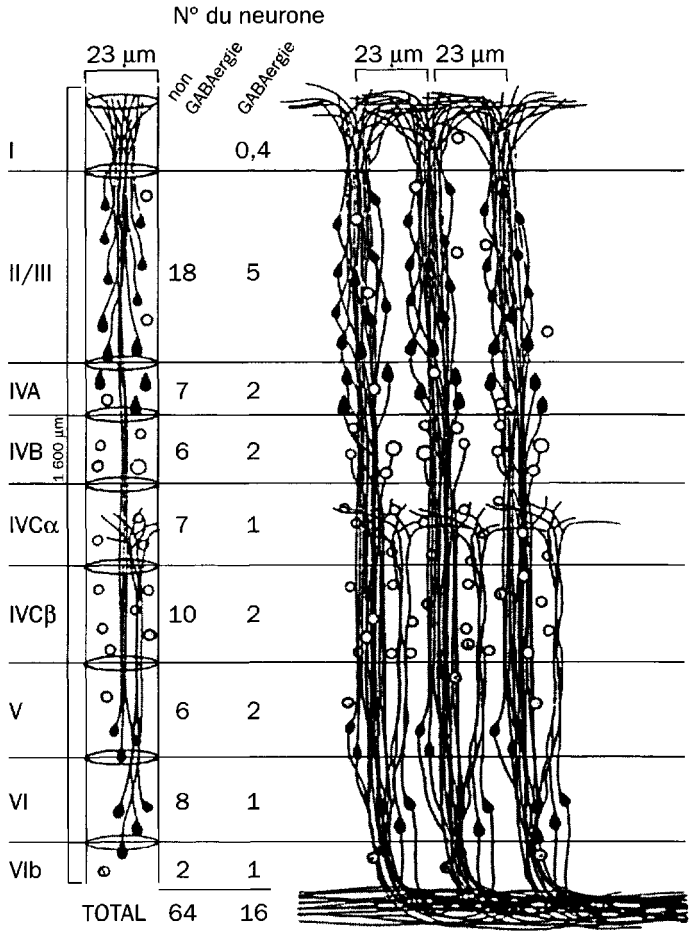


Figure 8 – Reproduction de colonnes du cortex visuel (d'après PETERS & SETHARES, 1996)
A gauche : organisation d'une partie des dendrites
A droite : ensemble des dendrites et des axones

4.4. LA CONNECTIVITÉ LONGUE ET SON ARTICULATION AVEC LA CONNECTIVITÉ COURTE

La connectivité longue concerne les liaisons anatomiques entre centres, appelées « projections ». D'une importance considérable, l'étude de la connectivité longue est toujours d'actualité, même chez les espèces où elle est le mieux connue. Cette étude repose sur l'utilisation du flux axoplasmique (voir § 2.1.2) car celui-ci permet le transport de substances traceuses dont la visualisation indiquera le trajet ou la provenance des axones concernés.

L'étude de la connectivité longue consiste d'abord en l'établissement de la carte des chemins reliant les différentes parties du système nerveux central. L'inventaire de ces voies n'est toujours pas terminé alors qu'il est souvent indispensable pour

l'interprétation de nombreux travaux en neurophysiologie. La connaissance des voies anatomiques est également très importante en neurologie où elle sert à l'interprétation des signes cliniques et à la localisation des lésions responsables de ces signes.

Mais la connectivité longue ne se réduit pas à ce genre de catalogue car chaque projection possède un ensemble de caractéristiques fonctionnelles importantes :

✓ des caractéristiques purement quantitatives, comme
- le nombre de neurones de projection (voir § 2.1.1.) et leur proportion dans le centre d'origine,
- les rapports de convergence et de divergence, qui sont définis respectivement par le nombre moyen de neurones projetant sur une même cellule cible et le nombre moyen de cellules cibles contactées par un même axone de projection,

✓ des caractéristiques spatiales, qui comprennent notamment la topologie de la projection avec en premier lieu son degré de somatotopie. Celui-ci est une mesure de la conservation, au sein des terminaisons, des relations de voisinage existant entre les différentes parties du centre d'origine. La géométrie de certaines projections peut prendre en outre une forme très complexe.

Un autre aspect important de la connectivité longue est déterminé par les relations topographiques qui existent, au sein de la même structure neuronale, entre les territoires des terminaisons de projections de sources différentes (figure 9).

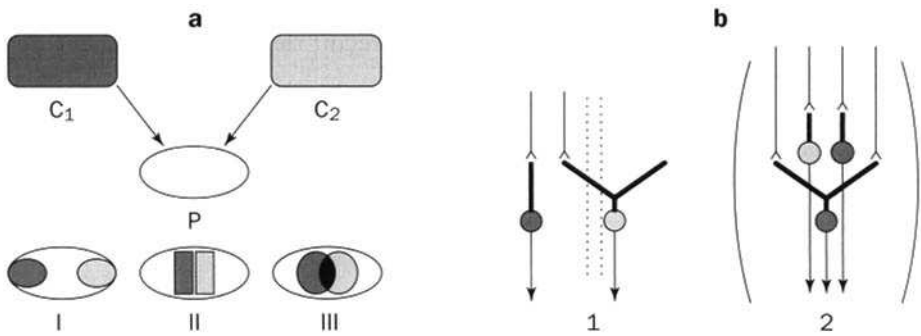


Figure 9 – Projections et organisation locale

Les axones sont figurés en traits fins, les dendrites en traits épais.

a - exemples de rapports entre les territoires de projection de deux centres C_1 et C_2 à l'intérieur d'une même structure anatomique (P). Les schémas I, II et III représentent trois cas typiques.

b - exemples d'articulation avec l'organisation locale :
1. dans le cas illustré en a II (territoires proches dont les frontières sont figurées par des pointillés verticaux), les terminaisons issues de C_1 peuvent faire synapse avec les dendrites de neurones situés dans les territoires de projection de C_2, bien qu'elles soient extérieures à ce territoire. Ceci rend possible une convergence malgré la séparation des deux territoires,
2. pour le cas illustré en a-III (recouvrement), dans la zone de recouvrement dont les frontières sont représentées par les deux lignes courbes verticales, il peut, au contraire, y avoir ségrégation des neurones cibles. Malgré la fusion des projections de C_1 et C_2 en cette région, il n'y a pas convergence pour tous les neurones concernés (situation illustrée par les deux neurones du haut).

Deux territoires de terminaison peuvent ainsi :

- ✓ être éloignés au sein de la structure de projection. A moins d'identifier un circuit interne au centre de projection, circuit reliant les territoires concernés, la probabilité que les informations provenant des deux sources interagissent est alors faible (figure 9a.I),
- ✓ être au contraire proches mais disjoints (figure 9a.II),
- ✓ enfin se chevaucher, voire se recouvrir complètement, ce qui suggère de fortes interactions entre les messages nerveux issus des deux sources (figure 9a.III).

Enfin, l'influence des connexions longues sur le fonctionnement des centres impliqués ne peut être vraiment comprise qu'en considérant également la façon dont les deux types de connexions, longues et courtes, s'articulent. Les fibres nerveuses qui se terminent dans un centre s'insèrent en effet dans les circuits locaux de celui-ci d'une manière très variable d'un centre à un autre, et aussi, pour un même centre, d'une projection à une autre. Cette variabilité concerne non seulement l'identité mais aussi la position de la fibre dans les circuits locaux des cellules contactées. Ainsi l'action d'un centre sur un autre sera-t-elle très différente selon que les neurones cibles sont des interneurones (voir § 2.1.1.) inhibiteurs ou des neurones de projection (figure 10). La localisation sur les dendrites des synapses formées, ou encore les rapports de convergence et de divergence mentionnés ci-dessus, sont d'autres paramètres très importants fonctionnellement. Pour ces différents éléments, les informations fournies par la microscopie électronique sont très précieuses. La manière dont les informations véhiculées dans les axones d'une projection sont traitées dans le centre qui les reçoit dépend évidemment de cet ensemble d'interactions.

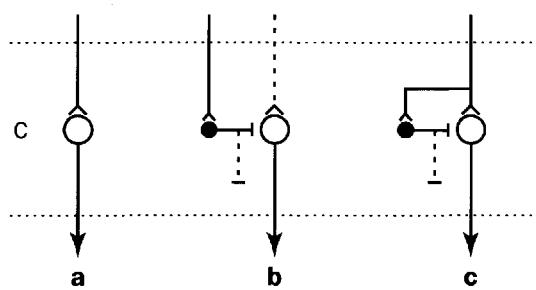


Figure 10 – Connectivité longue et connectivité courte

Exemples très simplifiés de modes d'articulation entre connectivité longue (fibres afférentes et efférentes, en haut et en bas respectivement) et connectivité courte (éléments situés à l'intérieur du centre C dont les limites sont représentées par les deux lignes pointillées horizontales). Les neurones de projection sont représentés par des cercles vides, les interneurones, par des cercles pleins.

a - relais excitateur simple

b - le relais sur l'interneurone, qui est inhibiteur, a l'effet contraire sur le neurone de projection. Ce sont d'autres fibres (dont l'une est représentée en pointillé) qui activent le neurone de projection.

c - une même fibre afférente peut former les deux types de connexion.

En **b** et en **c**, l'axone de l'interneurone est représenté avec une branche collatérale (trait pointillé) qui symbolise d'autres effets possibles sur les circuits locaux du centre.

Une fonction donnée (la perception d'une couleur, la saisie manuelle d'un objet...) dépend donc de l'activité coordonnée, grâce à la connectivité courte, de groupes de neurones distribués dans des zones anatomiques distinctes et reliées entre elles selon la connectivité longue.

5. *CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*

Nous avons présenté ici un résumé des données actuelles relatives à la physiologie neuronale car toutes les opérations réalisées par le Système Nerveux reposent sur elles quel que soit le domaine de la physiologie auquel on s'intéresse. Ces données concernent un niveau d'analyse essentiel, intermédiaire entre celui des mécanismes moléculaires et celui de l'organe entier, niveaux auxquels on se réfère pourtant souvent davantage. Un fait majeur mis en évidence par l'examen de ces propriétés est la très grande diversité des neurones. L'ensemble des propriétés en question constitue un vaste répertoire dont chaque type neuronal particulier ne possède qu'une partie. Cette diversité apparait de plus en plus marquée au fur et à mesure que de nouvelles populations de cellules nerveuses sont caractérisées en détail sur les plans morphologiques, biophysiques et neurochimiques. Ces études sont nécessaires à une pleine compréhension des opérations réalisées par les centres nerveux où se trouvent les neurones concernés. Plus largement, on peut en espérer la découverte de règles permettant de construire une taxinomie neuronale pertinente du point de vue fonctionnel, ce qui aurait pour effet de remédier en partie à la disparité des types cellulaires en intégrant ceux-ci dans un tableau cohérent.

L'étude de phénomènes cellulaires peu ou pas abordés ici peut aussi avoir des conséquences importantes sur notre compréhension de ce niveau de fonctionnement. Ceci est particulièrement vrai pour les communications inter-cellulaires par diffusion des transmetteurs dans le milieu extra-cellulaire et pour la nature des relations entre cellules nerveuses et cellules gliales. On peut d'ailleurs considérer ces deux groupes de phénomènes comme les deux volets d'un même ensemble. Il s'agit en effet chaque fois des relations fonctionnelles entre le neurone et son milieu proche, et plus précisément de la manière dont ce milieu régit à chaque instant l'expression des propriétés décrites dans ce chapitre. Enfin, du point de vue des grandes fonctions physiologiques la question la plus importante reste celle des rapports entre d'une part ces processus cellulaires si riches et variés et d'autre part les capacités fonctionnelles des ensembles constitués par ces cellules. Là, nous pensons qu'on peut attendre beaucoup du progrès des connaissances relatives à l'organisation fine et détaillée de la connectivité neuronale. Des tentatives pour formaliser celle-ci pourraient également s'avérer instructives.

PRINCIPALES ABRÉVIATIONS

F farad
LTD long term depression
LTP long term potentiation
ms milliseconde
mV millivolt
nm nanomètre
PA potentiel d'action
PPS potentiel post-synaptique
PR potentiel de repos
V écart entre le potentiel trans-membranaire et le potentiel de repos
Ω ohm
µm micron

RÉFÉRENCES

P. BRODAL - *The Central Nervous System*. Oxford University Press, Oxford, New York (1992).

R.L. COWAN & C.J. WILSON - Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the medial agranular cortex. *J. Neurophysiol.* **71**, 17-32 (1994).

C. HAMMOND & D. TRITSCH - *Neurobiologie cellulaire*. Doin, Paris (1990).

B. HILLE - Ionic basis of resting and action potentials. *In : Handbook of Physiology : The nervous system*, vol. 1. E.R. KANDEL, J.M. BROOKHARDT & V.M. MOUNTCASTLE eds, Williams & Wilkins, Baltimore, 99-136 (1977).

T.M. JESSELL & E.R. KANDEL - Synaptic transmission : a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Neuron* **10** (Suppl.), 1-30 (1993).

A. LAVIN & A.A. GRACE - Physiological properties of rat ventral pallidal neurons recorded in vivo. *J. Neurophysiol.* **75**, 1432-1443 (1996).

R. MILES & R.K. WONG - Unitary inhibitory synaptic potentials in the guinea-pig hippocampus in vitro. *J. Physiol. London* **356**, 97-113 (1984).

A. PETERS & C. SETHARES - Myelinated axons and the pyramidal cell modules in monkey primary visual cortex. *J. Comp. Neurol.* **365**, 232-255 (1996).

W. RALL - Core conductor theory and cable properties of neurones. *In : Handbook of Physiology : The nervous system*,vol. 1. E.R. KANDEL, J.M. BROOKHARDT & V.M. MOUNTCASTLE eds, Williams & Wilkins, Baltimore, 39-98 (1977).

M. RAPP, I. SEGEV & Y. YAROM - Physiology, morphology and detail passive models of guinea-pig cerebellar Purkinje cells. *J. Physiol. London* **474**, 101-118 (1994).

G.M. SHEPERD - *The synaptic organization of the brain*. Oxford University Press, Oxford (1998).

A.M. THOMSON, D. GIRDLESTONE & D. WEST - Voltage-dependent currents prolong single axon postsynaptic potential in layer III pyramidal neurons in rat neocortical slices. *J. Neurophysiol.* **60**, 1896-1907 (1988).

ANNEXE X

RÔLE FONCTIONNEL DE LA CONNECTIVITÉ ET DES COORDINATIONS NEURONALES DANS UN SYSTÈME SENSORIEL : EXEMPLE DU PREMIER RELAIS DES VOIES OLFACTIVES

Patrick MOUCHET

La perception des odeurs est une des fonctions dont on sait précisément qu'elle est remplie grâce à l'activité coordonnée de populations neuronales. Les principes régissant ces opérations semblent communs à la plupart des espèces, vertébrés et invertébrés confondus.

Les molécules odorantes interagissent avec des récepteurs sensoriels spécifiques disséminés sur toute la surface réceptrice (la muqueuse olfactive chez les vertébrés) : il n'y a donc pas de zones de la surface préférentiellement dévolues à la détection d'odeurs particulières. Les interactions molécules odorantes-récepteurs activent des cellules réceptrices dont les axones projettent sur le premier centre de relais des voies olfactives. Les informations engendrées par les cellules réceptrices subissent un premier traitement dans ce centre, lequel projette à son tour sur des structures plus haut situées dans le système nerveux central (cortex olfactif chez les vertébrés). L'exemple que nous allons prendre ici est limité à ce qui se déroule dans le premier centre de relais [15].

Ce centre est le bulbe olfactif chez les vertébrés, le lobe antennaire chez les insectes. L'organisation de ce centre (phénotypes cellulaires, arrangement spatial des neurones) revêt des formes variées selon les espèces, mais elle se conforme partout aux mêmes grands principes. Le centre est toujours constitué de neurones de projections qui enverront les informations aux centres plus haut situés, et d'interneurones inhibiteurs (dans chacun de ces groupes, des subdivisions existent, mais leur prise en compte n'est pas nécessaire à l'exposé des principes résumés ici). Les interneurones participent au traitement de l'information olfactive reçue par le centre, traitement dont le « résultat » est communiqué à la station suivante par les neurones de projection (figure AX.1).

---

15 G. LAURENT, M. STOPFER, R.W. FRIEDRICH, M.I. RABINOVICH, A. VOLKOVSKII & H.D.I. ARBABANEL - Odor encoding as an active, dynamical process: experiments, computation and theory. *Ann. Rev. Neurosci.* **24**, 263-297 (2001).

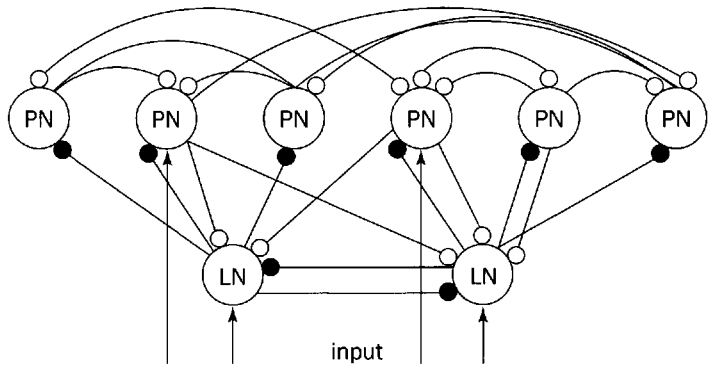


Figure AX.1 - Représentation schématique d'une partie des circuits locaux du premier centre de relais olfactif (ici le lobe antennaire du criquet)
(d'après [16], avec l'autorisation d'Elsevier)
Les informations olfactives (input) sont adressées aussi bien aux interneurones inhibiteurs (LN) qu'aux neurones de projection (PN). Les cercles vides symbolisent des connexions excitatrices, les cercles pleins, des connexions inhibitrices.

L'inhalation d'une espèce moléculaire odorante évoque l'activité d'une population neuronale (une centaine de cellules chez les insectes dont le lobe antennaire a été particulièrement bien étudié). Une espèce moléculaire chimiquement tres différente évoque l'activité d'une autre population, mais avec souvent des recouvrements avec la population précédente (figure AX.2a). Un neurone donné participe donc à la détection d'odeurs différentes.

Le support physiologique de l'étape initiale de l'opération consistant à identifier une odeur est ainsi à rechercher au niveau d'une population neuronale, et pas seulement de ses neurones constitutifs. C'est en effet la composition du groupe de neurones qui répondent à un stimulus olfactif donné qui est spécifique de ce stimulus (mais aussi, comme on va le voir, des stimuli qui lui ressemblent). La réponse de la population dure quelques centaines de millisecondes. Lorsqu'on en fait une détection globale par l'enregistrement du champ électrique engendré par les réponses de tous les neurones de projection de la population (le potentiel de champ local, qui se mesure dans la zone où se terminent les axones des neurones de projection) cette réponse collective a la forme d'une activité cyclique faite de lentes oscillations (figure AX.2b). Ces oscillations sont caractéristiques de l'odeur inhalée.

Le rôle des coordinations neuronales au sein de la population apparaît de manière remarquable lorsqu'on examine comment sont détectées des odeurs associées à deux molécules chimiquement proches, et dont on sait par des tests comportementaux que l'animal les distingue parfaitement. Dans cette situation, du fait de la proximité chimique des espèces moléculaires, c'est le même groupe de neurones

16. M. BAZHENOV, M. STOPFER, M.I. RABINOVICH, R. HUERTA, H.D.I. ABARBANEL, T.J. SEJNOWSKI & G. LAURENT - Model of transient olfactory synchronisation in the locust antennal lobe. *Neuron* **30**, 553-567 (2001).

qui assure la détection de l'une et de l'autre (figure AX.2c). La combinatoire des neurones activés n'est donc plus suffisante pour effectuer la discrimination entre les odeurs inhalées. Le résultat important ici est que cette distinction ne peut plus se faire si une partie des inhibitions réalisées par les interneurones est supprimée. Ceci est obtenu expérimentalement par l'administration dans le centre d'un bloquant pharmacologique de certains récepteurs au GABA (voir § 3.1.2), le neurotransmetteur utilisé par les interneurones. Les effets synaptiques rapides du GABA sont alors supprimés. Dans ces conditions, une activité est toujours évoquée dans la population neuronale par l'inhalation de la substance, mais l'animal ne peut plus identifier laquelle des deux espèces moléculaires est responsable. Au contraire, des produits odorants chimiquement éloignés restent discernables. C'est donc uniquement la distinction fine entre odeurs proches qui est altérée. La réponse des neurones constitutifs pris individuellement ne change pas : il n'y a pas de modification de la fréquence moyenne d'émission des PA, ni de leur probabilité d'émission au cours du temps (voir plus loin).

D'autres résultats montrent que l'effet des inhibitions brèves est de synchroniser transitoirement les réponses de sous-groupes de neurones au sein de la population. Au cours de la réponse au stimulus, pour chaque neurone la probabilité d'émission d'un PA fluctue avec le temps et on vient de voir que ces fluctuations considérées isolément sont indépendantes des actions synaptiques rapides des interneurones. En revanche, ces inhibitions rapides mettent en phase les activités de certains neurones à des moments précis du cycle global de réponse. La composition du sous-groupe dont la probabilité d'émission est maximale varie d'un instant à l'autre au cours de la durée de la réponse d'ensemble de la population. C'est la distribution au cours du temps et dans la population des sous-groupes de neurones émettant des PA qui diffère entre les deux odeurs (figure AX.2c).

Cette structuration fine dans le temps et l'espace (figuré ici par la population cellulaire) des activités des membres de la population repose sur les interconnections en inhibition latérale. La suppression pharmacologique de la composante rapide de ces inhibitions abolit les synchronisations résultantes, alors que l'activité globale continue de signaler la présence d'une odeur qui sera reconnue de manière moins précise. Dans cet exemple, c'est donc bien le détail de la connectivité locale qui est responsable du phénomène fonctionnel régissant la distribution spatiale et temporelle des synchronisations au sein de la population, phénomène sur lequel repose la détection olfactive fine réalisée par l'animal. Ce détail des connexions inclut l'identité des neurones interconnectés, les délais de transmissions et d'intégration des informations dans cet ensemble de connexions ainsi que la manière dont les fibres afférentes s'articulent à cet ensemble (voir § 4.3 et 4.4).

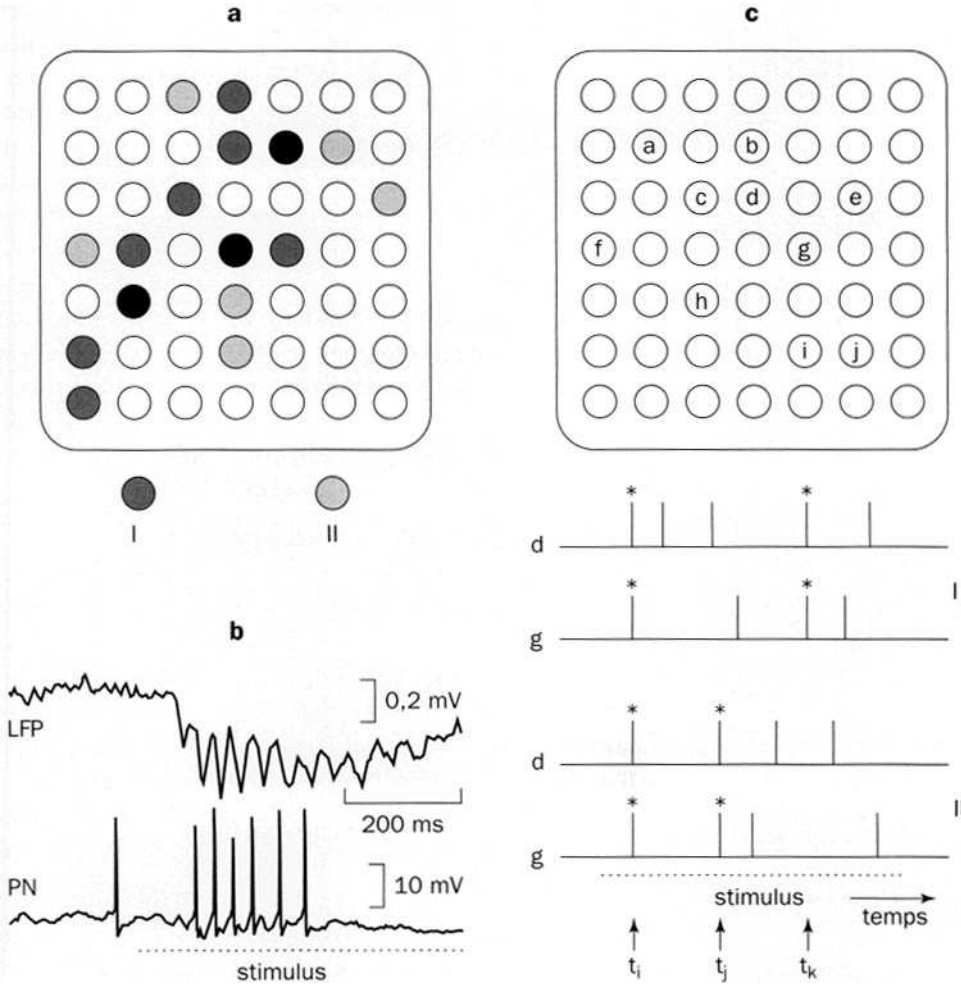


Figure AX.2 - Réponses du lobe antennaire des insectes à des stimuli olfactifs

a - schéma symbolisant la réponse du lobe antennaire à deux odeurs chimiquement éloignées (I et II). Chaque odeur évoque une activité dans une sous-population différente de neurones (cercles gris) représentant approximativement 10% de la population totale du centre de relais. Les cercles noirs désignent des neurones participant à la détection de l'une ou l'autre odeur.

b - enregistrements de la réponse du lobe antennaire à l'inhalation d'une substance odorante (stimulus) (d'après [16], avec l'autorisation d'Elsevier). Tracé du bas : activité électrique d'un neurone de projection. Tracé du haut : activité d'ensemble (LFP) des neurones de projection enregistrée dans la structure de relais suivante. Les oscillations présentées par l'activité d'ensemble servent de repère temporel auquel sont rapportés les moments d'émission des PA engendrés sur les neurones de projection. A chaque extremum du cycle, un certain nombre de neurones de projection émettent un PA.

c - schéma symbolisant la détection de deux odeurs chimiquement proches (I et II) par une sous-population de neurones du lobe antennaire. C'est le même ensemble de neurones (marqués par des lettres de a à j) qui code les deux odeurs. La distinction entre celles-ci repose sur des temps de synchronisation différents à l'intérieur de la population codante. Le neurone d est par exemple synchronisé avec le neurone g aux temps t_i et t_k (*) pour l'odeur I, aux temps t_i et t_j pour l'odeur II.

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

GLOSSAIRE

Les mots en ***gras italique*** renvoient à des entrées du glossaire.

A

Acétylcholine - médiateur chimique du ***système nerveux parasympathique***. Cette substance entraîne un ralentissement cardiaque, une vaso-dilatation du système capillaire, une diminution de la pression artérielle...

Acide aminé (AA) - petite molécule dont la forme générale est donnée par un atome de carbone portant toujours un radical carboxyl COOH, un groupe amine NH_2 ainsi qu'un groupement latéral distinctif. Au nombre de 20, ils composent les protéines, qui sont des chaînes d'acides aminés.

Acide hyaluronique - polymère constitué de dimères répétés d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine. De poids moléculaire très élevé, il forme le cœur des ***protéoglycanes*** présents dans les matrices extracellulaires.

Actine - protéine très abondante dans les cellules eucaryotes, interagissant avec beaucoup d'autres ***protéines***. La forme globulaire monomérique (actine G) polymérise pour former les filaments d'actine (actine F). Dans différents types de cellules, dont les cellules musculaires, l'actine F interagit avec la ***myosine*** en provoquant une contraction de la cellule.

ADN - acide désoxyribonucléique. C'est le polymère de ***nucléotides*** qui constitue le matériel génétique de toutes les cellules vivantes et de beaucoup de virus. Dans le génome des procaryotes, mais aussi de la plupart des mitochondries, des chloroplastes et de certains virus, l'ADN existe sous forme d'un cercle fermé (ADN circulaire).

ADN polymérase I - enzyme permettant la synthèse de l'ADN.

ADN satellite - ADN correspondant à la partie du génome condensée dans l'hétéro-chromatine ; cet ADN est très répétitif.

ADNase I - enzyme permettant la digestion partielle de la *chromatine*.

ADP - voir ATP.

Adrénaline - médiateur chimique du ***système nerveux sympathique***. Cette substance entraîne une accélération cardiaque, une vaso-constriction capillaire, une élévation de la pression artérielle...

Allèle - version différente ou copie d'un même gène, définie comme une séquence nucléotidique codant pour une information fonctionnelle. Cette séquence peut

présenter des variations susceptibles de modifier ou non l'état fonctionnel du produit du gène, depuis son inactivation jusqu'à sa sur-expression. Les allèles ne modifiant pas ou peu la fonction des produits du gène sont appelés allèles sauvages, les allèles modifiant beaucoup la fonction du produit du gène sont appelés allèles pathologiques ou délétères.

Amorce d'ARN - séquence d'ARN permettant l'initiation de la ***réplication***.

Anabolisme - processus de synthèse des molécules biologiques.

Anticodon - succession, dans une molécule d'***ARN de transfert***, de 3 nucléotides correspondant aux 3 ***bases*** d'un codon, lue en sens inverse et transformée selon la règle A → T, T → A, C → G, G → C.

Anticorps - molécule protéique capable de reconnaître spécifiquement une autre protéine ou portion de protéine (antigène).

Apoptose - mort cellulaire programmée (assimilée à un « suicide » de la cellule).

ARN - acide ribonucléique. C'est une macromolécule monocaténaire (en une seule chaîne) composée de ***nucléosides*** contenant le sucre ribose, des groupes phosphoriques (ribonucléiques) et les bases azotées adénine, guanine, cytosine et uracile. On distingue en particulier, suivant leur fonction, les ***ARN de transfert*** (ARNt), les ***ARN messagers*** (ARNm) et les ARN ribosomaux (ARNr).

ARN de transfert (ARNt) - ARN permettant de fixer de manière sélective un acide aminé et de le transporter jusqu'au site de polymérisation protéique dans le ribosome.

ARN messager (ARNm) - ARN reproduisant la séquence duale d'un ***gène*** et transportant cette information jusqu'au ribosome, où la protéine codée par le gène sera synthétisée.

ARN polymérase - enzyme permettant la synthèse d'***ARN messager*** dans le mécanisme de ***transcription***.

ATP - adénosine-triphosphate. Petite molécule composée d'adénine, de ribose et de trois groupements phosphates. Elle constitue la principale source d'énergie chimique dans les cellules. L'hydrolyse d'un groupement phosphate s'accompagne de la libération d'une quantité importante d'énergie : elle aboutit à la formation d'adénosine-diphosphate ou **ADP** en libérant un phosphate inorganique (Pi).

ATP synthétase (ou **ATP synthase**) - complexe enzymatique membranaire des mitochondries assurant la synthèse d'***ATP*** en utilisant l'énergie fournie par le gradient électrochimique en protons.

Attracteur - utilisé en mathématiques pour définir un état asymptotique, ce terme définit ici l'état ou la séquence d'états d'un organisme vivant vers lesquels on revient systématiquement, après toute perturbation limitée, lorsque le temps augmente indéfiniment.

Auto-fécondation - mécanisme permettant la rencontre, au sein d'un même organisme vivant sexué, des ***gamètes*** mâles et femelles fabriqués par cet organisme.

Auxotrophe - se dit d'un mutant nécessitant la présence d'un substrat (***acide aminé*** par exemple) pour croître.

B

Bactérie - microorganisme dont la ***membrane plasmique*** est le plus souvent doublée d'une paroi rigide et qui ne possède pas d'enveloppe isolant le ***génome*** du ***cytoplasme***. Les bactéries constituent le vaste groupe des ***procaryotes***.

Bases - les bases pyrimidiques (cytosine et thymine dans les ADN, cytosine et uracile dans les ARN) et puriques (adénine et guanine dans les ADN et ARN) sont constituées respectivement des radicaux pyrimidine et purine, composés d'atomes d'azote, de carbone et d'hydrogène, auxquels s'ajoute (sauf pour l'adénine) un radical basique amine accepteur de proton (au sens de BRÖNSTEDT) NH_2.

Bicouche lipidique - dans les membranes des cellules, les lipides, dont les plus abondants sont les phospholipides, s'organisent en une structure en double feuillet avec les chaînes aliphatiques hydrophobes à l'intérieur et les têtes polaires hydrophiles situées sur les deux surfaces en contact avec l'extérieur.

Blastoderme - nom conventionnellement donné aux très jeunes embryons lorsqu'il n'y a pas encore de feuillets distincts identifiables.

Blastomère - premières cellules provenant de la division de l'œuf fécond.

C

Cadhérines - famille de molécules d'adhérence cellulaire, jouant un rôle dans la ***différenciation cellulaire*** et la structure des tissus.

Canalisation (*channeling* en anglais) - mécanisme de passage rapide du produit d'une réaction à l'***enzyme*** catalysant la réaction suivante dans la voie métabolique ; l'efficacité d'un tel passage est assuré par la formation d'un complexe entre les différentes enzymes de la voie métabolique minimisant la diffusion libre des métabolites intermédiaires.

Canaux ioniques - molécules protéiques incluses dans la membrane de très nombreuses cellules, dont les neurones. Ils se répartissent en de nombreuses familles, possédant chacune plusieurs types différents. A chaque famille sont associées une ou parfois plusieurs espèces ioniques (sodium ou sodium et potassium, par exemple). Selon l'état où se trouve un canal donné, l'ion ou les ions spécifique(s) peuvent (état ouvert) ou non (état fermé) le traverser dans le sens de leur gradient électro-chimique. L'état du canal est déterminé soit par le voltage trans-membranaire, soit par l'action d'un agent chimique.

Carcinogène - produit susceptible d'entraîner la cancérisation d'un tissu.

Caryotype - ensemble des ***chromosomes*** du noyau d'une cellule, classés selon des critères de taille, de forme.... Le caryotype met en évidence l'existence de chromosomes surnuméraires, comme dans le cas de la trisomie 21 chez l'homme.

Catabolisme - processus de dégradation des molécules biologiques.

Cellule de PURKINJE - type neuronal le plus remarquable du cervelet (très volumineux centre nerveux situé dans la partie postérieure de la fosse cranienne). Ce neurone se caractérise notamment par ses arborisations dendritiques, qui sont d'une extême abondance et toutes situées dans un même plan, orienté de manière identique pour tous ces neurones.

Cellules endothéliales - voir endothélium.

Cellules germinales - c'est le biologiste allemand August WEISMANN qui introduisit à la fin du XIXe siècle la distinction entre cellules somatiques et cellules germinales et évoqua la différenciation très précoce de ces 2 lignées au cours du développement embryonnaire. Les cellules germinales sont les cellules qui participent à la formation des ***gamètes*** : il y a donc une succession ininterrompue, de générations en générations d'individus, de cellules germinales passant alternativement par des phases de ***diploïdie*** et d'***haploïdie***. A l'opposé, les ***cellules somatiques*** finissent toujours par mourir avec l'individu qui les portent.

Cellules pacemaker - nom communément donné aux cellules douées d'une activité rythmique ***endogène***. Le qualificatif vient du nom de *pacemaker* attribué au nœud sinusal, qui représente le centre principal de l'automatisme cardiaque. Par analogie, ce nom de pacemaker a été donné aux stimulateurs cardiaques implantables qui assurent artificiellement les mêmes fonctions. Certaines cellules nerveuses possèdent aussi des propriétés pacemaker. Leur degré de synchronisation (parfois absent) est toutefois beaucoup moins fort que celui des cellules cardiaques.

Cellules somatiques - ensemble des cellules non reproductrices.

Cellulose - polymère de glucose, formant des fibrilles de quelques nm de diamètre dans les tissus végétaux ; c'est un des constituants majeur des parois végétales formant une biomasse très importante. Ce biopolymère présente de nombreuses applications industrielles.

Centromère - partie centrale d'un ***chromosome*** unissant les deux bras appelés ***chromatides***.

Centrosome - organelle située près du noyau des cellules. C'est un centre organisateur des ***microtubules***.

Chitine - polymère de la N-acétyl-glucosamine dont l'association latérale en fibrilles, de quelques nm de diamètre, forme un des constituants majeurs des squelettes externes des arthropodes. La chitine est présente aussi chez les champignons.

Chondrocyte - cellule différenciée du cartilage, de forme arrondie, synthétisant les constituants de la ***matrice extracellulaire*** cartilagineuse, en premier le collagène de type II.

Chréode - métaphore due à WADDINGTON, qui assimile l'ontogenèse à la description d'une trajectoire sur une portion du ***paysage morphogénétique*** appelée chréode.

Chromatide - copie d'un ***chromosome*** encore unie à l'autre partie au niveau du ***centromère***.

Chromatine - matériel génétique nucléaire, constitué, dans les cellules eucaryotes, d'ADN et de protéines de liaison, appelées ***histones***, assurant la cohérence de sa structure tri-dimensionnelle.

Chromosome - unité du génome formée d'une molécule d'ADN ; les chromosomes sont associés par paire dans certains noyaux de cellules appelées diploïdes et sont isolés dans les noyaux des cellules dites haploïdes. Le chromosome peut être unique et circulaire (*E. coli*) ou rassemblé en 23 paires linéaires (homme).

CICR - nom anglais du mécanisme dit *Calcium Induced-Calcium Release* qui décrit l'auto-activation de la libération de calcium par le ***réticulum sarcoplasmique***. Ce mécanisme est déclenché par la faible quantité de cet ion ayant pénétré l'espace intracellulaire pendant le plateau du potentiel d'action cardiaque (courant rentrant calcique). Le calcium ainsi libéré par le réticulum sarcoplasmique est l'élément principal permettant la contraction cardiaque consécutive au passage du potentiel d'action. Cette auto-activation par CICR existe aussi chez la mitochondrie.

Cistron - gène de structure d'un ***opéron***.

Clonage - reproduction d'une cellule ou d'un organisme à partir d'un unique ancêtre, de manière asexuée (par greffe dans la plante, par fusion dans les unicellulaires...). Par extension, ce terme s'applique aussi à l'amplification de la quantité de certains constituants cellulaires comme l'ADN (***Polymerase Chain Reaction*** ou PCR).

Clonage positionnel - technique qui permet d'isoler un gène muté dont la transmission peut être suivie dans de nombreuses fratries grâce au ***phénotype*** secondaire à la mutation.

Code cyclique - procédé de codage par lequel les mots codants, supposés avoir m lettres, sont obtenus à partir d'un mot initial circulaire de n lettres (avec $n > m$), lu avec chevauchement par blocs de m lettres consécutives.

Code génétique - ensemble des règles d'affectation des 64 ***codons*** possibles aux 20 classes de synonymie de codons correspondant aux ***acides aminés*** et aux 2 classes correspondant aux signaux d'initiation et de terminaison des ***séquences*** protéiques.

Codon - succession de 3 ***nucléotides*** codant pour un acide aminé ou pour un signal d'initiation ou de terminaison d'une séquence protéique.

Codon stop - triplet de nucléotides codant pour l'arrêt de la ***transcription***. Il y a 3 codons stop : UAA, UAG, UGA.

Coefficient de sédimentation - grandeur scalaire caractérisant, en fonction de sa masse, l'aptitude d'une espèce chimique à sédimenter dans un champ gravitationnel (naturel ou créé par une centrifugeuse) .

Collagénase - ***enzyme*** protéolytique assurant la dégradation du ***collagène***. Les collagènases de mammifères sont des métallo-enzymes et sont spécifiques des différents types de collagène.

Collagène - principale protéine de structure des ***matrices extracellulaires***. Sa séquence en acides aminés est inhabituelle, très riche en glycine (30%), proline, ***hydroxyproline***, lysine et ***hydroxylysine*** ; elle ne contient pas de tyrosine ou de tryptophane. Sa structure correspond à une triple hélice de 300 nm de long et 15 Å de diamètre. Les fibrilles de collagène (en particulier le type I), très résistantes à la tension, sont formées de milliers de monomères alignés selon l'axe de la fibrille, avec un décalage latéral périodique régulier. Certains types de collagène ne forment pas des fibrilles mais des réseaux, comme le collagène de type IV présent dans les ***lames basales***.

Conformation (moléculaire) - arrangement tridimensionnel d'une macromolécule biologique. Plusieurs structures tridimensionnelles peuvent exister pour une même macromolécule, pouvant donner lieu à des changements de conformation.

Constante de fixation ou de dissociation - constante d'équilibre de la loi d'action de masse de la réaction de fixation ou de dissociation d'un ligand sur une macromolécule biologique (enzyme, récepteur...).

COT - concentration d'ADN renaturé obtenu au bout du temps T depuis le début du processus de renaturation.

Cristal liquide - état intermédiaire de la matière, présentant à la fois les propriétés d'écoulement d'un liquide et une anisotropie liée à l'ordre présent entre molécules, ou macromolécules, de formes allongées. Les modèles géométriques décrits par les physiciens des cristaux liquides se retrouvent au niveau de structures biologiques diverses : ***chromosomes***, parois végétales, matrice osseuse, squelettes d'invertébrés.

Crossing-over (ou **enjambement**) - mécanisme d'enjambements des molécules d'ADN des deux chromosomes d'une même paire de cellules diploïdes, permettant une recombinaison du génome. Les deux chromosomes résultant d'un crossing-over sont constitués, en mosaïque, des parties d'ADN situées entre deux enjambements, avec la règle qui consiste à changer de molécule chaque fois que l'on rencontre un nouvel enjambement.

Cyanobactéries - appelées aussi algues bleu-vertes, ces ***procaryotes*** ont un métabolisme photosynthétique. Selon la théorie endosymbiotique de l'évolution, les ancêtres des cyanobactéries actuelles sont les progéniteurs des chloroplastes.

Cycle cellulaire - ensemble des états successifs d'une cellule entre deux divisions. Il est constitué d'une phase G1 de croissance de la cellule sous l'action d'enzymes – produits de gènes exprimés durant cette phase – qui constituent les catalyseurs de son métabolisme. La phase G1 est suivie d'une phase S de synthèse du matériel nucléique, correspondant à la duplication de l'ADN nucléaire dans les cellules ***eucaryotes***. Ensuite, on observe une phase pré-mitotique G2 d'expression des gènes produisant les enzymes nécessaires à la mitose (cdc2kinase...). Enfin survient la mitose, dernière phase du cycle cellulaire dans le cas général.

Cytochrome - les cytochromes sont des enzymes de transfert d'électrons dont la couleur est due à leur groupe prosthétique de nature héminique. Dans la chaîne respiratoire, le cytochrome c est réduit par l'ubiquinone-cytochrome c réductase, puis oxydé par la cytochrome c oxydase qui transfère les électrons à l'oxygène.

Cytochrome c oxydase - dernier complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale (appelé aussi complexe IV) assurant la réduction de l'oxygène en eau. Chez l'homme, il est composé de 13 sous-unités dont 3 sont codées par le génome mitochondrial.

Cytodiérèse (ou **cytocinèse**) - division en deux parties du ***cytoplasme*** cellulaire, qui se fait chez la cellule animale par constriction de la cellule dans un plan équatorial déterminé par la position du fuseau mitotique.

Cytoplasme - Milieu entourant le noyau de la cellule et contenu à l'intérieur de la membrane cellulaire. Il consiste en une gelée sans forme particulière le ***cytosol***, soutenue par un ***cytosquelette*** et englobant un certain nombre d'organites qui participent au métabolisme de la cellule.

Cytosol - portion soluble du ***cytoplasme*** obtenue quand toutes les endomembranes et les organelles sont éliminées, en général par ultracentrifugation à haute vitesse. C'est un mélange très complexe contenant des ***protéines***, des ions et des métabolites variés.

Cytosquelette - réseau intracellulaire d'éléments fibreux comprenant les ***microtubules***, les microfilaments d'***actine***, et les filaments intermédiaires. Il détermine l'architecture dynamique de la cellule et ses propriétés mécaniques.

D

Dalton (Da) - unité de masse moléculaire, approximativement égale à la masse d'un atome d'hydrogène.

Dégénérescence - propriété du ***code génétique***, par laquelle plusieurs triplets de ***nucléotides*** (appelés aussi codons) sont traduits par le même ***acide aminé*** (AA). La dégénérescence provient du fait qu'il y a 64 triplets et seulement 20 AA.

Desmosome - structure d'adhérence permettant à une cellule animale d'adhérer fortement à une cellule voisine. Les molécules d'adhérence impliquées sont les ***cadhérines***, qui sont reliées dans le ***cytoplasme*** avec les filaments intermédiaires.

Différenciation cellulaire - mécanisme par lequel, avec le même matériel génétique nucléaire, on peut obtenir plusieurs schémas d'expression des gènes conduisant à un type cellulaire spécialisé.

Dimère - ensemble formé de 2 sous-unités distinctes, par exemple 2 protéines.

Diploïdie - état d'un noyau cellulaire possédant deux représentants (c'est-à-dire une paire) de chaque chromosome.

Disques imaginaux - sacs épithéliaux à l'intérieur desquels sont regroupées les cellules qui se transformeront lors de la métamorphose pour donner naissance aux différents segments et appendices de la ***drosophile***.

Dissection génétique - ensemble de méthodes génétiques qui vont permettre de localiser et d'ordonner entre elles les différentes régions régulatrices situées généralement en amont du ***promoteur*** d'un gène. C'est au niveau de ces régions régulatrices que se situent par exemple les sites de liaison des ***facteurs de transcription***.

Drosophile - insecte avec un thorax et un abdomen segmenté, avec une seule paire d'antennes et 3 paires de pattes, dont le nom commun est la mouche du vinaigre. C'est Thomas Hunt MORGAN (1866-1945) et son équipe, la *Fly-squad*, qui en fit un des animaux modèle de la biologie du développement. Son ouvrage *Génétique et Embryologie*, traduit par Jean ROSTAND, montre comment, avec de la curiosité, de la persévérance et finalement des moyens très simples, on arrive à révolutionner les concepts existants de l'embryologie et à être un des principaux fondateurs de la génétique.

Dynéine - moteur moléculaire interagissant avec les microtubules.

E

Echangeur (ou **antiport**) - transporteur membranaire assurant l'échange de 2 ions. Ex : échangeurs des nucléotides adényliques mitochondrial assurant l'échange (en sens inverse) d'une molécule d'ADP contre une molécule d'ATP.

Ectoderme - feuillet embryonnaire externe qui fournit la peau et ses annexes, ainsi que le ***système nerveux***.

Elastine - glycoprotéine de 70 kDa riche en glycine et en proline, de structure hélicoïdale. L'association latérale des hélices donne les fibres élastiques localisées dans les ***tissus conjonctifs*** qui subissent de fortes déformations, comme les vaisseaux, les poumons, la peau.

Electrophorèse - opération consistant à faire migrer des molécules dans un champ électrique, afin de les séparer en fonction de leur taille et de leur charge.

Electrotonique - ce terme désigne les phénomènes électriques (distribution du potentiel trans-membranaire, courants trans-membranaires et sous-membranaires) survenant dans des conditions pour lesquelles, en chaque région de la ***membrane cellulaire***, la résistivité électrique de la membrane reste constante au cours du temps.

Elutriation - technique de tri cellulaire associant une force centrifuge et une force centripète, qui permet de séparer les cellules en fonction de leur masse.

Endoderme - feuillet embryonnaire interne, qui fournit les appareils digestif et respiratoire.

Endogène - qualifie un processus provoqué par un mécanisme interne à la structure biologique concernée.

Endothélium - mono-couche de cellules aplaties qui tapissent tous les vaisseaux sanguins et régulent les échanges entre le sang et les tissus.

Enzyme - macromolécule protéique catalysant une réaction chimique dans les systèmes biologiques.

Epigenèse - terme désignant les modifications transmises à une cellule et à sa descendance par des processsus autres que ceux résultant de modifications génétiques. Si le facteur déclenchant de la transmission est une modification de l'environnement cellulaire, les modifications épigénétiques subsistent quand cette modification de l'environnement a disparu. Plusieurs ***phénotypes*** stables, issus d'un même ***génome***, peuvent alors co-exister dans des environnements identiques.

Epigénétique - qualifie un processus qui concerne l'épigenèse.

Epines dendritiques - petites excroissances présentes sur les dendrites de certains neurones. Elles sont souvent formées d'un cou, relié au tronc dendritique et se terminant par un renflement, la tête (environ 2 µm de diamètre).

Epissage - mécanisme permettant la constitution d'un « lasso » ou boucle d'une portion d'ARN, puis son excision.

Epissage alternatif - mécanisme par lequel un ***ARN messager*** est séparé en plusieurs parties, chacune contribuant à la synthèse d'une protéine.

Epissosome - association, à un ***intron*** à exciser, de protéines et de petits ARN nucléaires, appelés snRNA (small nuclear RNA).

Epithélium - ensemble de cellules juxtaposées, jointives, solidarisées par des systèmes de jonction et séparé du tissu conjonctif sur lequel il repose par une ***lame basale***. On peut distinguer les épithéliums de revêtement (qui couvrent l'individu ou bordent les cavités naturelles) et les épithéliums glandulaires, spécialisés dans l'élaboration de produits de sécrétion.

Espace périvitellin - espace situé entre la membrane plasmique du ***zygote*** et la membrane vitelline qui l'entoure.

Etape limitante - étape d'une chaîne métabolique imposant sa vitesse à l'ensemble de la chaîne à l'état stationnaire ; toute étape peut devenir limitante lorsqu'on en diminue l'activité (inhibition, diminution de la quantité d'enzyme...).

Eucaryote - se dit des espèces vivantes dont la ou les cellules ont une membrane nucléaire séparant le noyau du ***cytoplasme***.

Exogène - qualifie un processus provoqué par une cause extérieure à la structure biologique concernée.

Exon - séquence d'ADN d'un gène eucaryote codant pour une séquence de ***nucléotides*** de l'ARNm qui spécifie la séquence d'acides aminés d'une protéine.

F

Facteur de transcription (FT) - protéine requise pour initier ou contrôler la ***transcription***. Il en existe un très grand nombre que l'on classe essentiellement en fonction de la structure des domaines protéiques qui interagissent avec les sites de liaison de l'ADN. Dans les FT de type HLH, les éléments de base qui interagissent avec l'ADN sont deux séquences d'acides aminés capables d'adopter une disposition hélicoidale séparées par une boucle qui définit la position respectives des hélices entre elles et par rapport au site de liaison de l'ADN.

Fibres de PURKINJE - faisceau terminal du tissu de conduction cardiaque assurant l'activation endocardique des ventricules.

Fibroblaste - cellule du ***tissu conjonctif***, d'origine mésodermique, synthétisant les molécules des ***matrices extracellulaires*** : procollagène, ***fibronectine***, ***collagénases***.

Fibronectine - glycoprotéine formée de deux chaines, de 250 kDa chacune, reliées par des ponts disulfures. Elle présente des domaines spécifiques permettant des liaisons avec le ***collagène***, l'héparine, et certains récepteurs des membranes. La fibronectine est impliquée dans l'adhésion et l'étalement cellulaire.

Filaments intermédiaires - fibres du ***cytosquelette*** de 10 nm de diamètre, reliées aux différentes zones d'adhérence de la cellule (desmosomes et hémidesmosomes). Elles sont constituées de plusieurs types de protéines, comme la kératine, la desmine et la vimentine.

Fixation compétitive - fixation d'une molécule au site de fixation d'un substrat, conduisant à une compétition pour l'occupation du site.

Fluorescence - propriété de certaines molécules d'émettre de la lumière d'une longueur d'onde supérieure (décalage vers le rouge) à celle qui les a excitées.

Fluorochrome - colorant fluorescent.

Force vitale - réalité énergétique distincte de la matière, d'où émanent, selon le vitalisme, tous les phénomènes de la vie. (*Grand Robert de la langue française*)

Forme tautomérique - forme structurelle de l'ADN correspondant à un choix particulier de liaison des atomes d'hydrogène : par exemple la forme tautomérique

énol correspond à une liaison d'un atome d'hydrogène à l'oxygène lié au carbone 6 de la guanine, et la forme kéto à la liaison d'un atome d'hydrogène à l'azote en position 1 de la guanine. Les ***bases*** guanine et thymine passent le plus fréquemment d'une forme à l'autre, causant ainsi un changement de la conformation 3D de l'ADN.

Foyer ectopique - nom donné à une groupe de cellules recouvrant des propriétés anormales d'automatisme dans des conditions pathologiques susceptibles d'entraîner des contractions cardiaques surnuméraires ou extra-systoles, particulièrement dangereuses lorsqu'elles sont d'origine ventriculaire.

G

Gamète - cellule fille à noyau ***haploïde*** résultant de la méiose d'une cellule mère diploïde germinale chez un parent d'une population à reproduction sexuée. Le gamète peut-être mâle (spermatozoïde chez l'homme) ou femelle (ovule chez la femme) .

G-base, M-base, k-base - unités de dénombrement. Un Giga-base, correspond à 10^9 bases, un Méga-base à 10^6 bases, un kilo-base à mille bases. On dénombre ainsi les bases ou paires de bases, selon que l'acide nucléique est monocaténaire ou bicaténaire. Le kilo-base (kb) est utilisé comme unité de taille.

GDP - voir GTP.

Gène - unité fonctionnelle du ***génome***, c'est-à-dire plus petite unité capable d'expression sous forme d'une ou plusieurs ***protéines*** (suivant les conditions d'expression).

Gène de structure - gène s'exprimant par une protéine qui contribue à une fonction métabolique.

Gène domestique - gène s'exprimant pendant tout le ***cycle cellulaire*** (par exemple parce que la protéine résultant de son expression est une enzyme d'un ***métabolisme*** de base nécessaire à la vie cellulaire, comme la respiration mitochondriale ou la glycolyse).

Gène homéotique - gène qui, à l'état muté, conduit à l'« homéosis », c'est à dire la transformation totale ou partielle de structures d'un segment corporel en des structures correspondant à un autre segment.

Gène maître - dans un réseau de régulation global, gène à l'origine des principales régulations (inhibitions et activations) qu'il déclenche en cascade (en particulier dans la morphogenèse).

Gène zygotique - gène appartenant en propre au génome du zygote, comme le gène *hunchback*. Cette classification est établie par opposition aux gènes maternels qui participent au développement du zygote, dont l'exemple type est celui de *bicoïd*.

Génome - ensemble de l'information génétique d'une cellule ou d'un organisme.

Génotype - ensemble des potentialités génétiques d'une cellule ou d'un organisme.

Glie - ensemble d'éléments, les cellules gliales, qui forment avec les neurones la structure cellulaire du ***système nerveux*** central. Les cellules gliales sont plus nombreuses que les neurones et, à la différence de ces derniers, se divisent tout au long de la vie. Elles assurent la nutrition, l'entretien et la réparation du tissu nerveux, dont elles règlent aussi la composition du milieu extra-cellulaire. Certaines ont des fonctions immunitaires. Un autre sous-ensemble est spécialisé dans la synthèse de la gaine de ***myéline*** des neurones.

Glycine (Gly) - le plus simple des acides aminés. C'est un des résidus majeur du collagène et de l'élastine. La glycine n'est pas optiquement active.

Glycoprotéines - protéines associées de manière covalente à des unités saccharidiques de type mannose, N-acétyl glucosamine, N-acétyl galactosamine, galactose, fucose et acide scialique. Les liaisons sont soit O-glycosylées, *via* le groupement OH des résidus sérines ou thréonines, soit N-glycosylées, *via* le groupement NH_2 des résidus asparagines.

Glycosaminoglycanes - anciennement appellées mucopolysaccharides, ces molécules constituent les chaînes latérales polysaccharidiques des ***protéoglycanes*** et sont des séquences répétées de disaccharides dont un des sucres porte des charges latérales négatives (carboxyles ou sulfates). Les plus courants sont l'acide hyaluronique, le chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate ou le kératane sulfate.

GTP - guanosine tri-phosphate. Molécule impliquée (comme l'***ATP***) dans de nombreux processus énergétiques où elle fournit un phosphate, se transformant ainsi en GDP (c'est le cas lors de la polymérisation de la tubuline en ***microtubules***).

H

Haltères - sur les 2e et le 3e segments thoraciques de la plupart des insectes s'insèrent des ailes ; chez la ***drosophile***, la paire d'aile située au niveau du 3e segment thoracique involue pour donner une paire d'haltères qui ne servent plus qu'à l'équilibration en vol.

Haploïdie - état d'un noyau cellulaire ne possédant qu'un représentant de chaque ***chromosome***.

Haplotype - ensemble d'***allèles*** proches, situés sur le même ***chromosome***, et transmis ensemble lors de la ***ségrégation***.

Hélicase - enzyme permettant de dérouler l'ADN bicaténaire en deux simples brins.

Hélice alpha - repliement fréquent dans la structure secondaire des protéines dans lequel l'oxygène du carbonyle de la liaison peptidique à une position *i* forme une

liaison hydrogène avec l'atome d'azote de la liaison peptidique de l'acide aminé $i + 4$. Il faut 3,6 résidus pour faire un tour d'hélice.

Hémidesmosome - structure d'adhérence permettant à une cellule animale d'adhérer fortement à la ***matrice extracellulaire***. Dans cette structure, les ***intégrines*** interagissent à l'extérieur de la cellule avec des composants de la ***membrane basale*** comme la laminine ou le ***collagène***, et dans le cytoplasme avec les filaments intermédiaires.

Hétérochromatine - partie la plus condensée du génome nucléaire en interphase (c'est-à-dire entre 2 mitoses).

Histones - protéines nucléaires interagissant avec l'ADN pour contribuer à la morphologie 3D du génome nucléaire.

Homéostasie - régulation visant à maintenir les variables constantes ou périodiques du métabolisme d'une cellule ou d'un organisme vivant à leurs valeurs physiologiques (par exemple 1 g/l pour la glycémie humaine). De manière plus générale, les variables ayant un comportement dynamique de type ***attracteur*** sont préservées par l'homéostasie.

Homozygote - situation, chez un individu ***diploïde***, où, à un locus chromosomique donné, les 2 chromosomes homologues portent des copies d'un gène (ou ***allèles***) identiques. Lorsque les 2 allèles sont distincts, on parle d'hétérozygotie.

Hybridation (ou **renumérotation**, ou **réassociation**) - composition d'un ADN bicaténaire par appariement des ***bases*** de deux simples brins selon la dualité adénine-thymine et cytosine-guanine.

Hybridation *in situ* - technique consistant à révéler la localisation de l'expression d'un gène en marquant ses ***ARNm*** à l'aide de ***sonde*** d'acides nucléiques marquées par un isotope radioactif ou par un autre procédé.

Hydroxylysine - forme hydroxylée de la lysine, fréquente au niveau de collagène.

Hydroxyproline - forme hydroxylée de la proline contrôlée par l'activité de la prolyl hydroxylase, dont l'activité intervient avant que le polypeptide acquière sa structure en hélice. Ce résidu essentiel dans le ***collagène*** assure la stabilité de la triple hélice.

I

Immunoglobulines - protéines impliquées dans la réponse immunitaire.

Indice centromérique - rapport entre les longueurs p du bras court et q du bras long d'un ***chromosome***.

Intégrines - famille de protéines présentes à la surface des cellules et impliquées dans l'adhérence des cellules à la ***matrice extracellulaire*** (en se liant à la ***fibronectine***, la ***laminine***...) ou à d'autres cellules par interaction avec des membres de la ***superfamille des immunoglobulines***. Leur structure consiste en un hétérodimère

avec une sous-unité β de 95 kDa très conservée et une sous-unité α de 150-170 kDa plus variable. Les premiers exemples décrits sont les récepteurs localisés au niveau de la surface des ***fibroblastes*** se liant à la fibronectine et à la vitronectine extracellulaires. La liaison à la protéine ligand se fait au niveau d'une séquence protéique spécifique RGD correspondant aux trois acides aminés : Arg-Gly-Asp.

Interphase - période du cycle cellulaire située entre deux mitoses de la cellule.

Intron - ***séquence*** d'ADN non codante d'un gène eucaryote qui est transcrite en ARN (transcrit primaire), mais qui sera excisée par ***épissage*** lors de la constitution de l'***ARNm***.

Ischémie - terme dérivé du grec *ischios* = peu et *hémos* = sang, définissant une réduction plus ou moins sévère de l'irrigation sanguine au niveau d'un organe.

J

Jonctions cellulaires - régions spécialisées de la surface cellulaire permettant aux cellules d'adhérer entre elles. Les jonctions serrées *(tight junctions)* se trouvent dans les tissus épithéliaux et empêchent le passage des fluides à travers la couche cellulaire. Les desmosomes et les jonctions d'adhérence forment des plaques connectées aux filaments intermédiaires et interviennent dans l'adhérence entre les cellules et entre les cellules et la ***matrice extracellulaire*** (***hémidesmosomes***).

K

Kinase - enzyme impliquée dans la ***phosphorylation*** d'une molécule.

Kinésine - moteur moléculaire utilisant l'ATP pour se déplacer sur les ***micro-tubules*** et impliqué dans le transport de beaucoup de composants cellulaires.

L

Lame basale - réseau de composants de la ***matrice extracellulaire*** formant un film situé sous les couches de cellules épithéliales et les groupes de cellules organisées, qui les sépare du ***tissu conjonctif***. Elle contient du ***collagène***, de la ***laminine*** et des ***protéoglycanes***.

Laminine - glycoprotéine de la ***matrice extracellulaire***, formée d'une sous-unité α de 200 kDa et d'une sous-unité β de 400 kDa. C'est un composant majeur des ***membranes basales*** qui induit l'adhésion et l'étalement de nombreux types cellulaires en culture.

Liaison 5'-3' - liaison entre deux ***nucléotides*** unissant le carbone 5' du premier au carbone 3' du second.

Liaison covalente - liaison chimique qui correspond à une association électronique stable entre deux atomes qui mettent en commun une paire d'électrons.

Liaison N-osidique - liaison entre l'azote N d'une ***base*** purique ou pyrimidique et le carbone 1 d'un sucre à 5 atomes de carbone, à l'intérieur d'un ***nucléotide***.

Ligand - toute molécule pouvant se fixer à une protéine. Ex : substrat, produit, inhibiteur d'une enzyme, hormone sur un récepteur, etc.

Ligase - enzyme permettant la soudure longitudinale de deux brins consécutifs d'ADN.

Locus - emplacement physique d'un ***gène*** sur un ***chromosome***.

M

Macrophage - cellule phagocytaire des mammifères dérivant des monocytes du sang. Leurs propriétés varient selon leur localisation. Elles agissent sur la destruction de bactéries, protozoaires et cellules tumorales en stimulant les cellules du système immunitaire.

Matrice extracellulaire - ensemble des macromolécules sécrétées localement par les cellules dans l'espace extracellulaire de la plupart des tissus. Composée de protéines (***collagène***...) et de polysaccharides (acide hyaluronique...), cette matrice est organisée en réseaux plus ou moins compacts et ordonnés qui occupent un volume important dans les ***tissus conjonctifs*** tels le derme ou les tendons.

Mécanotransduction - transformation de signaux mécaniques en signaux biologiques, permettant à un système biologique (cellule, tissu...) de modifier ses propriétés sous l'action de contraintes mécaniques (pressions, étirements, écoulements...).

Méiose - mécanisme de division d'une cellule mère ***diploïde*** en deux cellules filles ***haploïdes***.

Membrane basale - voir lame basale.

Membrane biologique - bicouche lipidique (exemples : membrane plasmique, membranes mitochondriales...).

Membrane plasmique - membrane phospholipidique qui entoure une cellule vivante. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation des échanges avec le milieu extérieur et la transmission bi-directionnelle d'informations entre les espaces intra- et extracellulaires.

Mésoderme - feuillet embryonnaire situé entre l'endoderme et l'ectoderme, et qui fournit notamment la musculature, le sang, le squelette, les reins.

Métabolisme cellulaire - ensemble des réactions chimiques de la cellule catalysées par des ***enzymes***.

Méthylation - fixation d'un radical méthyle CH_3, en général sur les cytosines des doublets CG.

Microfilaments (ou **filaments d'actine**) - fibres du ***cytosquelette*** de 7 nm de diamètre formées d'***actine*** et associées avec différentes protéines liant l'actine.

Microsatellites - séquences localisées très répétitives dispersées dans le ***génome*** tous les 25 à 100 kbases.

Microtubules - tubules cytoplasmiques de 25 nm de diamètre externe et dont la paroi mesure 5 nm en épaisseur. Chaque microtubule est constitué par l'association d'hétérodimères α et β qui polymérisent en formant des filaments qui s'agencent ensuite en tubules simples ou parfois doubles.

Mitose - division du noyau d'une cellule ***eucaryote*** conduisant à la formation de deux cellules filles ayant le même nombre de ***chromosomes*** que la cellule mère (du grec *mitos* (fil), traduisant l'aspect des chromosomes).

Molécules d'adhérence cellulaire (CAMs) - protéines membranaires impliquées dans les liaisons cellule/cellule. On distingue 3 classes majeures : les ***cadhérines***, les sélectines et des membres de la ***superfamille des immunoglobulines***.

Monoamines - petites molécules neurotransmettrices formées par hydroxylation, éventuellement décarboxylation et ***méthylation***, d'un acide aminé. Les principales sont la sérotonine et les catécholamines (dopamine, noradrénaline et adrénaline). Les monoamines sont le prototype du neuro-transmetteur à action modulatrice.

Morphogènes - molécules de signalisation cellulaire et intercellulaires qui agissent localement pour organiser le ***patron*** de ***différenciation cellulaire*** en fonction des variations spatiales de leur concentration.

Mutation ponctuelle - substitution d'une ***base*** par une autre dans la séquence du ***génome***, du fait de l'action de facteurs mutagènes physico-chimiques, en général ***exogènes*** (comme les agents ionisants).

Myéline - gaine lipidique enveloppant certains axones chez les vertébrés. Elle est synthétisée par des cellules non nerveuses. La myéline abaisse la capacité et augmente la résistance membranaire dans des proportions considérables (autour de 250 fois). La vitesse de conduction des potentiels d'action sur les axones myélinisés est considérablement accrue de ce fait.

Myosine - moteur moléculaire, utilisant l'énergie chimique de l'ATP pour produire un déplacement le long de fibres d'***actine***. Elle est impliquée dans la contraction musculaire ainsi que dans les contractions et le mouvement cellulaires.

N

NADH - Nicotinamide adénine dinucléotide réduit.

NADPH - nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit. Porteuse d'un ion hydride H^-, cette molécule est impliquée dans les mécanismes énergétiques d'oxydation-réduction cellulaire.

Nœud de RANVIER - courte interruption de la gaine de ***myéline*** d'un axone. C'est à ce niveau que se font les flux ioniques trans-membranaires lors de la propagation des potentiels d'action sur les axones, car les canaux ioniques responsables y sont très concentrés. Les noeuds de Ranvier sont espacés régulièrement le long de l'axone, la longueur inter-nodale représentant environ mille fois celle du noeud.

Nucléation - phase critique dans l'apparition d'un cristal ou l'assemblage d'un polymère au cours de laquelle un petit nombre d'unités s'agrège pour initier un processus de croissance ou d'extension rapide.

Nucléole - structure intranucléaire dans laquelle l'ARN ribosomal est transcrit et où a lieu son assemblage avec des protéines pour constituer les sous-unités ribosomales.

Nucléoside - combinaison d'une base azotée (base purique – adénine (A) ou guanine (G) – ou base pyrimidique – cytosine (C), thymine (T) ou uracile (U) –) avec un sucre qui peut être un ribose ou un désoxyribose (nucléoside = base + sucre). On obient ainsi l'adénosine, la guanosine, la cytidine, la thymidine (dans l'ADN), l'uridine (dans l'ARN).

Nucléosome - zones de condensation et de super-enroulements du ***génome*** nucléaire.

Nucléotide - ester des nucléosides, désigné par un sigle qui spécifie le nucléoside (première lettre) et le nombre de phosphates présents (lettres suivantes). (nucléotide = base + sucre + phosphate). Ex. : ATP (adénosine triphosphate), GMP (guanosine monophosphate). Les acides nucléiques comme l'ADN sont formés par une séquence linéaire de nucléotides liés par un pont phosphodiester entre les atomes de carbone 3' et 5'.

O

Oligomérisation - polymérisation d'un petit nombre de sous-unités identiques. Ex : oligomérisation d'une enzyme en tétramère.

Oncoprotéines - protéines impliquées dans un processus de cancérisation ou oncogenèse.

Ontogénèse - succession des étapes de la construction d'un individu d'une espèce au cours de son embryogénèse. Une loi phénoménologique, énoncée E. HAECKEL, déclare que l'ontogénèse des vertébrés récapitule en partie leur ***phylogénèse***. Cette observation fait encore l'objet de passionnantes controverses.

Opéron - ensemble de ***gènes*** bactériens contigüs transcrits en une seule molécule d'ARNm et participant à une même fonction métabolique (exemple de l'opéron lactose, contrôlant le métabolisme du lactose).

Oxydation phosphorylante - processus aérobie de ***phosphorylation*** de l'ATP couplé au fonctionnement de la chaîne respiratoire ou de transfert d'électrons. La

chaîne respiratoire de la membrane interne mitochondriale utilise le ***NADH*** ou le $FADH_2$ pour transférer des électrons jusqu'à l'oxygène.

P

Patron (ou **pattern**) - le patron ou motif (*pattern*) d'un organisme, d'un organe, désigne un arrangement spatial spécifique des différentes cellules les unes par rapport aux autres (ex. : position des segments chez la ***drosophile***, organisation des bourgeons plumaires sur l'épiderme de poulet...).

Paysage morphogénétique - surface abstraite, définie par l'ensemble des concentrations des constituants de l'organisme en cours de formation qui varient au cours du temps.

Peptides - molécules formées d'une courte chaine d'***acides aminés*** (de cinq à quelques dizaines au plus). Ils résultent du clivage de précurseurs protéiques de plus grande taille.

Phénotype - ensemble des caractéristiques observables d'un individu, alors que le ***génotype*** correspond à l'ensemble des informations codées dans le ***génome*** d'un individu.

Phosphorylation - réaction dans laquelle un groupement phosphate se lie par une ***liaison covalente*** à une molécule.

Phylogenèse - succession des espèces dans un arbre évolutif décrivant leurs ancêtres et descendants. Cet arbre peut être construit sur la base de similarités de séquences des ***génomes***, ou de parenté dans l'organisation des ***métabolismes***.

Plaque (d'adhérence) focale - zone d'ancrage de la surface d'une cellule au substrat sur lequel elle se déplace. Dense aux électrons en microscopie électronique, cette plaque d'environ $1 \times 0{,}2$ µm a son grand axe dans la direction du mouvement. Elle est associée à des faisceaux de microfilaments intra-cytoplasmiques reliés à la ***membrane plasmique*** par l'intermédiaire de protéines d'adhérence.

Ploïdie - nombre de copies de chaque ***chromosome*** présent dans le noyau cellulaire. Si n est le nombre de chromosomes du génome haploïde de l'espèce considérée, un génome diploïde contient 2 n chromosomes, un génome tétraploïde 4n chromosomes. L'aneuploïdie désigne une quantité d'ADN anormale.

Pluripotence - se dit d'une cellule capable de participer à la formation de tissus différents (ex. : cellules souches).

Pôle rostral - pôle situé du côté du rostre, partie la plus antérieure de l'embryon.

PolyA polymérase - enzyme permettant la synthèse de nucléotides adénines à l'extrémité 3' d'un ***ARN messager***, afin d'assurer sa stabilité.

Polyadénylation - synthèse d'une séquence d'adénines.

Polynucléotide - molécule constituée par une succession de ***nucléotides***.

Polypeptide - assemblage d'***acides aminés***.

Potentiel transmembranaire - différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule au repos, de – 70 à – 90 millivolts. Dans les cellules excitables (nerf, cœur, muscle squelettique, muscle lisse) ce potentiel transmembranaire, stable au repos, subit un ensemble de modifications au cours de l'activité cellulaire; ces modifications peuvent constituer un potentiel d'action.

Primase - enzyme permettant la synthèse de l'amorce d'***ARN***.

Procaryote - être vivant unicellulaire, tel que les bactéries, dont le matériel génétique n'est pas nettement séparé du ***cytoplasme***.

Proline (Pro ; PM 115) - acide aminé dont la structure diffère de celle des autres acides aminés par son groupement amine secondaire caractéristique d'un imino acide. La proline influence la structure secondaire des protéines. Elle est abondante dans le ***collagène***.

Promoteur - séquence nucléotidique de l'ADN à laquelle l'***ADN polymérase*** se lie pour commencer la ***transcription*** de l'ADN en ARN. Durant la ***transcription***, l'ADN polymérase se déplace le long de l'ADN.

Protéines - polymères linéaires d'***acides aminés*** joints par des liaisons amide –CO-NH- (***liaison peptidique***) et dont la séquence correspond à un enchaînement spécifique. La fonction amine alpha-NH_2 du premier acide aminé (côté N-terminal) et le résidu carboxylique alpha-COOH du dernier acide aminé de la protéine (côté C-terminal) sont libres.

Protéoglycane - association de protéines et de polysaccharides formant des complexes de haut poids moléculaire. Localisés dans les tissus squelettiques de vertébrés, l'os et le cartilage, ils déterminent les propriétés viscoélastiques des tissus. Des protéoglycanes sont aussi présents à la surface des cellules.

Pseudo-gène - séquence d'ADN équivalente à celle d'un ***gène***, mais ne codant pas pour une ***protéine***.

Purine - base comportant un noyau purine (un hexagone carboné portant deux azotes en 1 et 3, uni à un pentagone carboné portant deux azotes en 7 et 9). L'adénine et la guanine sont des purines.

Pyrimidine - base comportant un noyau pyrimidine (un hexagone carboné portant deux azotes en 1 et 3). La cytosine, la thymine et l'uracile sont des pyrimidines.

R

Récepteurs ionotropes - récepteurs spécifiques de certains neurotransmetteurs et constitués par un canal ionique dont l'ouverture est induite par la fixation du transmetteur.

Récepteurs métabotropes - protéines membranaires fixant spécifiquement certains neurotransmetteurs et déclenchant à la suite de cette fixation, par l'intermédiaire de protéines associées, une cascade de réactions métaboliques à effets multiples.

Rectification retardée (courant de) - courant trans-membranaire provoqué par l'ouverture de canaux potassiques dépendant du voltage et dépourvus de variable d'inactivation. C'est le courant sortant, initialement décrit par HODGKIN et HUXLEY. Le qualificatif « retardé » traduit le fait que, bien que rapide, ce courant s'active après le courant entrant sodique.

Régulation globale (schéma de) - schéma de régulation comportant les ***gènes*** (ou leurs produits d'expression) et les liaisons d'inhibition et d'activation qu'ils entretiennent avec les autres gènes (ou leurs produits).

Rendement quantique - rapport quantité de lumière émise / quantité de lumière absorbée par un ***fluorochrome***.

Réplication - mécanisme de doublement du matériel génique.

Réplicon - unité de réplication individuelle, située sur l'ADN chez les ***eucaryotes***.

Réseau de gènes - ensemble de gènes participant à la même fonction. Ces gènes sont soumis à une régulation ***endogène***. Ils comprennent des ***promoteurs*** et des répresseurs et contrôlent une fonction cellulaire ou tissulaire, physiologique ou pathologique (ex. : réseau de floraison régulant la morphogenèse des fleurs).

Réseau métabolique - ensemble de réactions enzymatiques du métabolisme cellulaire reliées par les métabolites intermédiaires.

Réticulum endoplasmique - compartiment membranaire ramifié dans le ***cytoplasme***. Le réticulum endoplasmique rugueux lie les ***ribosomes*** qui traduisent les ARN messagers codant pour les protéines sécrétées et pour la plupart des protéines membranaires. Le réticulum endoplasmique lisse n'a pas de ribosomes fixés. C'est un site de synthèse des lipides membranaires.

Réticulum sarcoplasmique - structure située dans le ***cytoplasme*** (ou sarcoplasme) de la fibre myocardique. L'un des rôles principaux est de servir de réserve intracellulaire pour l'ion Ca^{++} (voir le mécanisme ***CICR***).

Rétroposon - ***transposon*** exigeant, avant d'avoir sa copie insérée dans le ***génome*** à une autre place que la séquence initiale, d'avoir une version ARN transcrite en ADN par la ***transcriptase inverse***.

Rétrovirus - famille de virus dont le génome est formé d'une molécule d'ARN contenant le gène de la transcriptase inverse.

Révertant - retour d'un mutant au ***phénotype*** initial.

Ribosome - organite cellulaire qui asure la ***transcription*** des ARN messagers en protéines. Il est formé lui-même de protéines et de molécules d'ARN, les ARN ribosomaux.

S

Ségrégation - mécanisme par lequel le ***génome*** d'une cellule ***diploïde*** se sépare en deux génomes de ***gamètes*** haploïdes. Chez les organismes à reproduction sexuée, ce mécanisme permet la transmission d'une moitié du génome de chaque parent à leurs descendants.

Séquence codante - voir exon.

Séquence consensus - séquence de deux ***nucléotides*** GU à l'extrémité 5' d'un intron indiquant le site d'initiation de l'***épissage***.

Sélectines - famille de protéines adhésives, exprimées essentiellement dans le compartiment vasculaire, les cellules endothéliales et les globules blancs. Ces protéines transmembranaires, par leur interaction avec des ligands glycosylés, interviennent dans les premières étapes des interactions entre les globules blancs et l'***endothélium***, où les leucocytes roulent à la surface de l'endothélium.

Site actif ou site catalytique - partie d'une enzyme où se passe la réaction enzymatique.

SNAREs (*Soluble-N-ethyl maleimide sensitive factor Attachment Protein REceptor)* - protéines impliquées dans vraisemblablement toutes les fusions membranaires ayant lieu dans les cellules eucaryotes. Le NSF (*N-ethyl maleimide Sensitive Factor*) est une ATPase soluble qui s'associe à SNAP (*Soluble NSF Associated Protein*), l'ensemble se fixant sur le complexe des SNAREs.

Sonde - petit polynucléotide ayant une séquence complémentaire d'une partie spécifique d'un ***gène*** (ADN) ou d'un ARN.

Spécificité de réaction - catalyse spécifique par une ***enzyme*** d'une réaction où un type de réaction donnée.

Stéréospécificité - partie de la spécificité due à l'arrangement dans l'espace de l'***enzyme*** (ex : utilisation par les enzymes du métabolisme des acides aminés L et pas D).

Superfamille des immunoglobulines - groupe de protéines possédant des domaines homologues aux immunoglobulines. Certaines molécules d'adhérence cellulaire appartiennent à cette famille.

Syncytium - Structure formée d'une membrane cellulaire entourant un grand nombre de noyaux plus ou moins dispersés dans le ***cytoplasme***, issus de multiples divisions du noyau (caryocynèse) sans division (sans ***cytodiérèse***) de la cellule.

Système nerveux autonome - partie effectrice du système nerveux ayant en charge le contrôle du milieu intérieur. Il est formé de deux composants, les systèmes sympathique et parasympathique. Certains auteurs lui ajoutent le système nerveux entérique, vaste ensemble de neurones situé dans la paroi digestive. Les actions sympathiques et parasympathiques sont généralement antagonistes, mais des coopérations positives entre les deux systèmes peuvent s'observer. Les deux systèmes agissent par l'intermédiaire de médiateurs chimiques, parfois libérés dans

la circulation sanguine (adrénaline pour système sympathique, acétylcholine pour le parasympathique). Le système sympathique élève la fréquence cardiaque via l'adrénaline et le système parasympathique la diminue via l'acétylcholine.

T

TATA box - séquence de ***nucléotides*** composée de thymine et d'adénine. Elle permet de fixer un ***facteur de transcription*** changeant localement la géométrie de l'ADN pour favoriser sa lecture par l'***ARN polymérase***.

Télomère - complexe nucléoprotéique situé à l'extrémité des ***chromosomes*** eucaryotes et impliqué dans la ***ségrégation*** des chromosomes.

Temps de doublement - temps nécessaire à une population cellulaire pour doubler son effectif.

Territoire présomptif - Ensemble des cellules qui, chez le très jeune embryon, sont à l'origine de la formation des différents organes. Ce terme fait référence aux expériences de marquage cellulaire réalisées au cours des premiers stades du développement embryonnaire avant les migrations cellulaires subséquentes et avant que toute ***différenciation cellulaire*** ne soit observable. Par exemple, l'ensemble des cellules du jeune embryon qui formeront ultérieurement le cœur est appelé le territoire présomptif cardiaque.

Tissus conjonctifs - tissus de soutien, très répandus dans l'organisme où ils sont présents aussi bien autour que dans les organes. Ils sont formés de 3 constituants : des cellules (***fibroblastes***, adipocytes...), des fibres de soutien (***collagène***, élastine...) et un compartiment aqueux contenant des ***protéoglycanes*** et des glycoprotéines en solution. Ils présentent un grand polymorphisme : par exemple, le derme est un tissu conjonctif riche en fibres de collagène et souple, alors que le tissu osseux est formé d'une matrice organique minéralisée très organisée.

Tissu de PURKINJE - nom globalement donné à l'ensemble des fibres de PURKINJE au niveau des ventricules cardiaques.

Traduction - ensemble des mécanismes qui permettent la synthèse des protéines à partir des ARNm, en faisant correspondre un acide aminé à un triplet de ***nucléotides***. La traduction s'effectue en suivant les règles d'affectation du ***code génétique***.

Transamination - transfert d'un groupement amine ($-NH_2$) d'un métabolite à un autre (ex : entre un acide aminé et un acide α-cétonique).

Transcriptase inverse - enzyme présente dans les ***rétrovirus*** permettant la synthèse d'une séquence d'ADN à partir d'une séquence simple brin d'ARN.

Transcription - mécanisme permettant la copie d'une séquence de nucléotides d'un gène sous forme de la séquence correspondante duale des nucléotides de son ***ARN messager***.

Translocation réciproque - mécanisme d'enjambement similaire au ***crossing-over***, mais entre les ADN des quatre chromosomes de deux paires distinctes.

Transports actifs - flux de matière transmembranaires consommant de l'énergie.

Transposon - séquences d'ADN nucléaire capables de réplication, dont la copie s'insère à un autre emplacement du génome.

Tubulines - famille de protéines du ***cytosquelette*** composée de trois protéines très conservées liant le ***GTP***. Les dimères de tubuline α/β polymérisent en ***microtubules***. La tubuline γ est impliquée dans l'organisation des microtubules au niveau des centrosomes.

V

Varicosité - petits renflements présentés par certains axones dans les régions qu'ils innervent. Les varicosités sont disposées en chaînes le long du trajet axonal et de nombreuses vésicules contenant le ou les transmetteurs utilisés par la fibre y sont stockées.

Virus - agent infectieux submicroscopique constitué d'un acide nucléique (ADN ou bien ARN dans le cas des ***rétrovirus***) contenu dans une enveloppe protéique, la capside. Il ne peut se reproduire que dans une cellule-hôte où la molécule d'acide nucléique, libéré de la capside, utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer.

Vitellus - mot tiré du latin (synonyme de *lécithe* du grec *lekitos*) qui signifie jaune d'œuf. Ces termes désignent par extension les réserves nutritives contenues dans le **cytoplasme** cellulaire.

Z

Zygote - (du grec *zugon* = ce qui joint) terme fréquemment utilisé pour désigner l'embryon unicellulaire issu de la fusion du spermatozoide et de l'ovule et les premiers stades du développement embryonnaire.

Cette page est laissée intentionnellement en blanc.

INDEX

A

acétylcholine 234
acide aminé 38,125,129,135,265
acide hyaluronique 161
acide nucléique 147
ADP 191
anticorps 88,116
actine 25,131,132,164
adhérence cellulaire 125
ADN 16,35,36
ADN circulaire 17
ADN monocaténaire 47
ADN satellite 46
ADNase I 53
ADN polymérase I 57
adrénaline 234
affinité 127,137
allèle 33,106
amorce d'ARN 57
anneau contractile 155
anticorps 86
apoptose 26,27,79
archaebactéries 14
arginine 186
ARN de transfert (ARNt) 48
ARN messager (ARNm) 17,43,88,100,116
ARN ribosomal 96
ARN polymérase 44,47
arythmie 237,243
ATP 22,23,132,154,191
ATP synthase (ou synthétase) 24,195
attracteur 32,61
auto-assemblage 67,168
auto-catalyse 70
auto-fécondation 33
auto-organisation 120,144
auxotrophe 186
axone 256

B

bactérie 13-15,52
base 36
bicoïd (gène) 100
bicouche 147
bicouche phospholipidique 16
bifurcation 144
biomasse 162
biomimétisme 171
biopuce 60
blastoderme 97,105
blastoderme cellulaire 108
blastomère 78
bouton synaptique 265
BrdU 86

C

cadhérine 126,134
Caenorhabditis elegans 111
cal réticuline 129
calcitonine 55
calpaïne 137
canal ionique 262
canalisation 186
cancer 125
capacité spécifique de la membrane ... 261
carbohydrate 128
carcinogène 57
cardiomycyte 211
caténine 131,134
Cdc42 138
cellule cancéreuse 54
cellule de PURKINJE 257,275
cellule endothéliale 128
cellule eucaryote 131
cellule excitable 211,214
cellule germinale 77,95
cellule gliale 254
cellule myocardique 232
cellule nodale 232
cellule *pacemaker* 232
cellule somatique 80
cellulose 162
centimorgan 41
centre nerveux 256
centrifugation différentielle 20
centromère 41
centrosome 20,76
chaîne α 128
chaîne β 128
champ morphogénétique 94
changement de conformation 129
chitine 162,165

chondrocyte 163
chorion 96
chréode 34
chromatide 41
chromatine 39,57
chromosome 33
cicatrisation 161
CICR 230
circuit local 279
cistron 52
clonage 125
clonage positionnel 99,105
coagulation 161
codage 102
codage génétique 107
code cyclique 39
code génétique 38
codon 38,59
codon stop 45
coefficient de contrôle d'un flux. 187
coefficient de sédimentation 50
collagénase 159
collagène 118,126,147,158
complexe focal 136
conformation 37,177,262
connectivité 278,280
connexine 135
connexon 135
constante de dissociation 177,183
constante de fixation 177,184
constante de MICHAELIS 183
constante électrotonique spatiale 260
contact focal 135
contreplaqué biologique 165
contre-récepteur 126
cortex cérébral 279
COT 39
cristal liquide 17,166
crossing-over 34,41
cuticule 167
cyanobactérie 15
cycle cellulaire 39,42
cytochrome oxydase 191
cytochrome c oxydase 22,191
cytochrome c 26
cytocinèse 75
cytodiérèse 75,151,155
cytoplasme 100,116,131,210
cytosol 21,23,25
cytosquelette 17,100,126-147,151,164

D

dalton 16,130,154,158
dégénérescence 38
dénaturation 39
dendrite 256
dendrite épineux 256
dépolarisation 214,230,268
dépression à long terme 276
desmosome 133,134
développement embryonnaire 129
dialogue morphogénétique 110
différenciation 78,113,129
différenciation cellulaire 46,108
dimère 130
diploïdie 77
disque imaginal 95
dissection génétique 106
domaine cytoplasmique 126
domaine immunoglobuline 129
dorsal (gène) 102
drapeau français (modèle du) 114
drosophile 94
dynéine 153

E

échangeur 191
ectoderme 78
élastase 160
élasticité 186,196
élastine 158,160
électrocardiogramme 236
électrophorèse 88
électrotonique 273
élutriation 89
embryogenèse 99
empreinte parentale 54
endoderme 78
endogène 32,116
endothélium 128
énergie d'activation 175
énergie libre de formation 175
enhancers 54
environnement extracellulaire 126
enzyme 175
épigenèse 108
épigénétique 34
épine dendritique 277
épissage 48,59
épissage alternatif 55
épissosome 48
épithélium 125,126,135
équation de MICHAELIS-MENTEN 183
équation du câble 260
E-sélectine 128
espace périvitellin 102
étape limitante 194
état quasi-stationnaire 182
eubactérie 14
eucaryote 13,76
even-skipped (gène) 105
évolution 14,111,128

exogène 18,34
exon 43
explant 164
extrémité N-terminale 25

F

facteur de transcription 101,105,110
faisceau de HIS 235
FAK 139
fécondation 96
feuillet cellulaire 102
feuillet embryonnaire 98
fibre de PURKINJE 227,235
fibre de stress 138
fibre myocardique ventriculaire 228
fibre nerveuse 256
fibrillation 242,248
fibroblaste 147,150,158,161,162,164
fibronectine 126,158,160
filament d'actine 131
filament intermédiaire 131,133
filopode 136
FITC 86
fixation compétitive 177
fluorescence 73
fluorochrome 82
flux axoplasmique 258
focalisation hydrodynamique 81
force de traction 136,163
force vitale 175,179
forme tautomérique 38
foyer ectopique 241
fragments d'OKASAKI 57
fushi tarazu (gène) 105

G

GABA 268
gamète 33
gap (gène) 104,105
Gbase 42
GC box 46
GDP 145
gel 161
gène 43
gène de polarité segmentaire 104,108
gène de structure 52
gène domestique 46
gène homéotique 109
gène maternel 99
gène morcelé 44
gène zygotique 101
génome 17,28,35,39,63,78,201
glie 254
glucose 52
glycine 158
glycoprotéine 89,127,160
glycosaminoglycane 158,161
gradient de morphogènes 100
gravité 144
GTP 47,51,133,145

H

haltère 109
haploïde 42
haplotype 43
hélicase 57
hélices α 19,160
hémidesmosome 134
hémostatique 171
hétérochromatine 42
hétérozygote 186
hexamère 135
histone 40,57,79
homéostasie 32
homozygote 99
hunchback (gène) 101
hybridation 39
hybridation *in situ* 88,100,105
hydrogénosome 22
hydroxylysine 158
hydroxyproline 158
hyperploïdie 80
hyperpolarisation 268

I

ICAM 129
ICAM-1 128
identification 184
immunodéficience 125
immunoglobuline 55,126
indice centromérique 41
information positionnelle 102,107
inhibition de croissance 133
intégration 272
intégrine 126,128,139,160,163
interneurone 257,282
interphase 73,76,79
intron 42,43
invagination 97,98
ischémie 248

J

jonction adhérente 130,134
jonction communicante 135
jonction intercellulaire 133
jonction serrée 133

K

kilobase 41
kinase 139
kinésine 153

L

lame basale 122,160
lamellipode 136,138
laminine 128,158,160,161
leucocyte 128
liaison 5' → 3' 36
liaison covalente 67,128
liaison hétérophilique 126
liaison homophilique 126
liaison N-glycosidique 36
ligand 102,126,127,177
ligase 57
locus 43
longueur électrotonique 260
L-sélectine 128
LTP 276
lysosome 15,21,27

M

macrophage 159
matrice extracellulaire 109,114,120,125
maturation 47
mécanotransduction 121,149
méiose 33,39
membrane 191
membrane basale 126
membrane cellulaire 126
membrane plasmique 16,161
mésoderme 78,98
métabolisme cellulaire 175
méthionine 51
méthylation 54
microbiologie cellulaire 15
microfilament 132
microsatellite 46
microtubule 101,118,131,144,153
migration 129
migration cellulaire 161
migration trans-endothéliale 140
mitochondrie 15,18,22,26,190,192
mitose 39,75,79,85,133
mode de propagation régénératif 262
molécule adhésive 126
molécule d'adhérence cellulaire 125
monoamine 267
morphogène 93,94,111,113
mort cellulaire programmée 26
MPF 80
mutant homéotique 109
mutation 58
mutation ponctuelle 39
myéline 256,263
myocarde 234
myosine 132,154,155

N

NADH 25,190
nanos (gène) 100,101
neurite 254
neurone 253
neurone de projection 257
neurotransmetteur 265
neurulation 98
nœud auriculo-ventriculaire 235
nœud de RANVIER 256,263
noeud sinusal 232
nucléole 20
nucléosome 40,57
nucléation 132
nucléotide 36,38,45,145,147,195

O

oligomérisation 179
oncoprotéine 89
ontogenèse 34
opéron 35,52
opéron lactose 52
opéron inductible 52
opéron répressible 52
organelle 131
os compact 167
ostéone 166
ovariole 95
ovocyte 96
ovogenèse 104
ovogonie 95
oxydation phosphorylante 23,187,190

P

pacemaker 239
pair-rule (gène) 104
parasegment 105,108
patch-clamp 220
patron (ou *pattern*) 93,113,123
paysage morphogénétique 34
peptide 267
période réfractaire 219
phase cholestérique 166
phase nématique 166
phase smectique 166

phénotype 33,106
phosphate inorganique 23
phosphorylation 139
phosphorylation glycolytique 23
phylogenèse 34
plan d'organisation 107
plaque d'adhérence focale 135,151
plaque d'adhésion 132
plaquette 128
plasticité synaptique 275
ploïdie 85,96
pluripotence 78
poids synaptique 275
point d'initiation 56
polarisation 129,259
polarité 99
polarité embryonnaire 104
polarité segmentaire 104
pôle rostral 97
polyA polymérase 48
polyadénylation 45
polynucléaire 159
polynucléotide 82
polypeptide 43
polyploïdie 96
porine 23
potentialisation à long terme 276
potentiel d'action 208,227,249,263
potentiel de repos 258
potentiel post-synaptique 272
potentiel transmembranaire 210
primase 57
procaryote 13,76
processus autocatalytique 230
production d'énergie 22
prolifération 129
proline 158
promoteur 44,54,106
propagation 262
propriété mécanique 163
protéine 14,35,79,100,125,192,210,230,262
protéine de liaison 132
protéoglycane 158,162
protéomique 60
P-sélectine 128
pseudo-gène 88
pulse-chase 87
purine 45
pyrimidine 57

R

radeau 17
réaction-diffusion 105,117,145
récepteur transmembranaire 102
récepteur 126,128
récepteur ionotrope 270
récepteur métabotrope 270
reconnaissance cellulaire 126
rectification retardée 263
réentrée 249
région régulatrice 107
régulation 179
rendement quantique 82
réplication 56
réplicon 56
réponse inflammatoire 140
réseau métabolique 175
réseau minéral 163
résistivité intra-cytoplasmique 260
résistivité membranaire 261
respiration cellulaire 22
réticulum endoplasmique 18,20,21
réticulum sarcoplasmique 230
rétrocontrôle 108
rétroposon 46
rétropropagation 274
rétrovirus 45
révertant 186
RhoA 138
ribosome 16,17,50,96
ribozyme 17

S

secteur membranaire Fo 25
segment 95,99,105,108
ségrégation 33
sélectine 126,140
séquence 105
séquence codante 43
séquence consensus 45,48
séquence RGD 160
signal 129
site actif 178
SNARE 19
soma 254
somatotopie 281
sommation spatiale 273
sommation temporelle 273
sonde 88
spécificité de réaction 178
stéréospécificité 177
structure électrotonique 261
structure en doigts de gant 54
substance blanche 256
substance grise 256
superfamille des immunoglobulines ... 126
synapse 260,264
syncytium 97,115
système nerveux autonome 228
système vasculaire 128

T

tapis roulant 132
TATA box 44
télomère 41,42,80
temps de doublement 87
territoire présomptif 78,94,103
TGF β 103
thérapie cellulaire 14
tissu automatique 228
tissu conjonctif 118,157,163,170
tissu de conduction 234
tissu de PURKINJE 233
tissu nodal 234
toll (gène) 102
traduction 38,48,100,108
transamination 177
transcriptase inverse 45
transcription 47,101
transcrit primaire 59
translocation 58
translocation réciproque 34
transport actif 259
transposon 39
trigger 230
troubles paroxystiques 241
tubuline 118,132,144

U

ubiquinone 24
unité de ségrégation 43
uracile 43

V

varicosité 265
VCAM-1 128
visqueux 161
vitellus 96
vitesse initiale 181
voie de signalisation 108

Z

zygote 77,97

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS 7

SOMMAIRE 11

I - COMPARTIMENTATION CELLULAIRE 13
Gérard KLEIN - Michel SATRE

1. Organisation des procaryotes 15

2. Les eucaryotes ont une structuration compartimentée 17
   2.1. Les organites intracellulaires 20
   2.2. Le fractionnement subcellulaire 20
   2.3. Le rôle central des mitochondries 22
      2.3.1. Mitochondries et bioénergétique cellulaire 23
      2.3.2. Rôle central des mitochondries
      dans le contrôle de la mort cellulaire programmée 26
   2.4. Les lysosomes : des organites au contenu acide
   qui contiennent une riche panoplie d'enzymes de dégradation 27

3. Conclusion 28

Références 28

II - ÉLÉMENTS DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE : LE MATÉRIEL HÉRÉDITAIRE 31
Olivier COHEN - Jacques DEMONGEOT

1. Brève histoire de la génétique de MENDEL à MONOD 31

2. Structure et dynamique de l'ADN 36
   2.1. Structure de base 36
   2.2. Dénaturation-réassociation de l'ADN 39
   2.3. Dynamique de l'ADN 39

3. Organisation de l'ADN : chromatine et chromosomes 39
   3.1. La structure de base, fibre de 100 Å de diamètre 40
   3.2. La superstructure de base, fibre de 300 Å de diamètre 40
   3.3. Organisation en chromosomes 40
      3.3.1. Morphologie commune 41
      3.3.2. Aspects en microscopie optique 42
         Aspects généraux
         Signification des bandes
      3.3.3. Aspects en microscopie électronique 42
   3.4. Dimension du génome haploïde 42

4. Différentes sortes d'ADN 43
   4.1. L'ADN « noble » : les gènes 43
      4.1.1. Définition 43

Le gène est l'*unité d'hérédité*
Le gène est un *message*
4.1.2. Structure d'un gène 44
La région en amont (5') est une région de régulation
La partie transcrite est constituée
4.1.3. Classement des gènes 45
Les gènes uniques ou quasi-uniques
Les familles de gènes
Les superfamilles
4.1.4. Une catégorie à part : les gènes domestiques 46
4.1.5. Les pseudo-gènes
4.2. L'ADN répété 46
4.2.1. L'ADN hautement répétitif 46
4.2.2. L'ADN moyennement répétitif 46

5. Expression des gènes 47
5.1. Transcription 47
5.2. Maturation des ARNm 47
5.2.1. Fixation d'une coiffe méthylée 48
5.2.2. Polyadénylation 48
5.2.3. Epissage ou excision des introns du transcrit primaire 48
5.3. La traduction 48
5.3.1. Les acteurs 48
5.3.2. Les différentes étapes 51
L'initiation
L'élongation
La terminaison et le re-largage du ribosome

6. Régulation de l'expression des gènes 52
6.1. Chez les procaryotes 52
6.1.1. Les opérons inductibles 53
6.1.2. Les opérons répressibles 53
6.2. Dans les systèmes eucaryotes 53
6.2.1. L'environnement chromatinien des gènes actifs 53
6.2.2. Zones super-enroulées et ADN de type Z 53
6.2.3. Régulation par méthylation 54
6.2.4. Régulation transcriptionnelle 54
Les éléments cis-régulateurs
Les facteurs trans-régulateurs
Régulation par choix du promoteur
6.2.5. Régulation post-transcriptionnelle 55
Epissage alternatif ou différentiel
Multiplicité du site de polyadénylation
Modulation de la durée de vie des ARNm
Stockage des ARNm
6.2.6. Régulation de la traduction 56

7. Maintien de l'intégrité de l'ADN 56
7.1. Réplication de l'ADN 56
7.1.1. Aspects généraux 56

7.1.2. Aspects morphologiques 56
Chez les procaryotes
Chez les eucaryotes
7.1.3. Aspects biochimiques : la fourche de réplication 57
7.2. Systèmes de réparation de l'ADN 57
7.2.1. Altérations de l'ADN 57
7.2.2. Les systèmes de réparation de l'ADN 58

8. Pathologies de l'ADN–Les mutations 58
8.1. Définition 58
8.2. Conséquences de la mutation 59
8.2.1. Mutations d'une séquence non-codante 59
8.2.2. Mutations dans les régions codantes 59
8.2.3. Mutations à effet quantitatif 59
8.2.4. Mutations silencieuses 59
8.2.5. Mutations instables 59

9. Conclusions et perspectives 60

Références 63

Annexe 1 - L'expérience princeps de MILLER et l'ARN archétypal 66
Jacques DEMONGEOT

Annexe 2 - Notion de réseau de régulation génétique 70
Jacques DEMONGEOT

III - CROISSANCE ET MULTIPLICATION CELLULAIRE 73
Didier GRUNWALD - Xavier RONOT

1. Le cycle cellulaire : une division qui multiplie 74

2. De la quantité à la complexité : la prolifération organisée 76
2.1. Procaryotes *versus* eucaryotes 76
2.2. Les organismes pluricellulaires : cycle et développement 77
2.3. La différenciation : de la pluripotence à la fonction unique 78

3. Problèmes et limites du cycle cellulaire 79
3.1. Problèmes 79
3.2. Limites 80

4. Méthodes d'étude du cycle cellulaire 80

5. Application de la CMF à l'étude du cycle cellulaire 82
5.1. Analyse monoparamétrée 82
5.1.1. Etude de la prolifération 83
5.1.2. Mesure de la ploïdie (index en ADN) 85
5.2. Analyse multiparamétrée 86
5.2.1. Marquage des cellules en phase S par incorporation de BrdU 86
5.2.2. Mesure de la durée du cycle 87
5.2.3. Cycle cellulaire et contenu en ARN 88
5.2.4. Cycle cellulaire et contenu en protéines 89

Références 90

IV - MORPHOGÈNES ET CHAMPS MORPHOGÉNÉTIQUES 93
Pierre-Simon JOUK

1. Introduction 93

2. La drosophile, animal modèle de la génétique du développement 94
   2.1. Ovogenèse et folliculogenèse 95
   2.2. Embryogenèse 97

3. L'établissement de l'information positionnelle 99
   3.1. La mise en place des axes corporels du zygote sous la dépendance de gènes maternels 99
      3.1.1. Mise en place de l'axe antéro-postérieur 99
      3.1.2. Mise en place de l'axe dorso-ventral 102
   3.2. Les gènes de segmentation 104
      3.2.1. Les gènes gap 105
      3.2.2. Les gènes pair-rule 105
      3.2.3. Les gènes de polarité segmentaire 108
   3.3. La spécification des segments : les gènes homéotiques 109

4. Conclusions et perspectives 110

Pour en savoir plus 111

Annexe - Information positionnelle, gradient morphogénétique et modèles de réaction-diffusion 113
Philippe TRACQUI
   A1. Codage par seuils et formalisation du modèle du drapeau français 114
   A2. De un à deux morphogènes : le couple activateur-inhibiteur dans les modèles de réaction-diffusion 117
      A2.1. Extension du cadre conceptuel proposée par A. TURING 117
      A2.2. Un exemple associant régulation temporelle et organisation spatiale 118
   A3. Information positionnelle et facteurs mécaniques 120

V - MOLÉCULES D'ADHÉRENCE ET SIGNALISATION CELLULAIRE 125
Alain DUPERRAY

1. Les molécules d'adhérence cellulaire 126
   1.1. Les sélectines 127
   1.2. Les intégrines 128
   1.3. La superfamille des immunoglobulines 129
   1.4. Les cadhérines 130

2. Le cytosquelette 131
   2.1. Les microfilaments 132
   2.2. Les microtubules 133
   2.3. Les filaments intermédiaires 133

3. Les jonctions intercellulaires 133
   3.1. Jonctions serrées 133
   3.2. Jonctions d'ancrage 134
      3.2.1. Jonctions cellule/cellule 134
      3.2.2. Jonctions cellule/matrice extracellulaire 135

3.3. Jonctions communiquantes 135
4. Rôles des molécules d'adhérence dans la migration cellulaire 135
4.1. Extension du corps cellulaire 136
4.2. Formation des points d'ancrage 136
4.3. Forces de traction 137
4.4. Rétraction et détachement de l'arrière de la cellule 137
4.5. Régulation de la migration 137
5. Molécules d'adhérence et signalisation 139
6. La réaction inflammatoire : un exemple faisant intervenir les différents mécanismes d'adhérence 140
7. Utilisation des protéines fluorescentes pour l'étude de la dynamique des assemblages adhésifs 142
8. Conclusion 142
Références 143
Annexe 1 - Auto-organisation biologique et structures hors-équilibre : l'exemple des microtubules 144
James TABONY - Nicolas GLADE
Annexe 2 - Caractérisation des forces de traction cellulaires 148
Philippe TRACQUI
Annexe 3 - Les moteurs moléculaires 154
Alain DUPERRAY
VI - MATRICES EXTRACELLULAIRES ANALOGUES BIOLOGIQUES DE CRISTAUX LIQUIDES 157
Marie Madeleine GIRAUD GUILLE
1. Introduction 157
2. Un réseau complexe de macromolécules 158
2.1. Les collagènes 158
2.2. Les fibres élastiques 159
2.3. Les glycoprotéines 160
2.4. Les polysaccharides 161
3. Rôle des matrices extracellulaires et relations avec les cellules 163
3.1. Forme, protection, locomotion 163
3.2. Relations cellules-matrices 163
3.2.1. Adhésion des cellules à la matrice 163
3.2.2. Comportement de fibroblastes en culture 164
4. Assemblage de macromolécules de structure 165
4.1. Assemblage ordonné dans les tissus 165
4.2. Analogues biologiques des cristaux liquides 165
4.3. Validation à l'échelle moléculaire 165
5. Conclusion et perspectives 171
Pour en savoir plus 173

VII - CINÉTIQUE ENZYMATIQUE ET CONTRÔLE DES FLUX 175
Jean-Pierre MAZAT

1. La cinétique enzymatique 175
   1.1. Introduction : pourquoi des enzymes ? 175
      1.1.1. Les enzymes accélèrent les réactions du métabolisme 175
      1.1.2. Les enzymes permettent un couplage entre des réactions dont l'une est thermodynamiquement défavorable 176
      1.1.3. Les enzymes sont spécifiques 177
         Spécificité de fixation
         Spécificité de réaction
      1.1.4. Les enzymes sont régulées 179
   1.2. L'équation de MICHAELIS-HENRI 179
      1.2.1. Historique 179
      1.2.2. L'équation de MICHAELIS-MENTEN-HENRI 180
         Le concept d'enzyme-substrat
         L'équilibre
         Approximation
         L'état stationnaire
         Propriétés d'une cinétique michaelienne
         L'équation de MICHAELIS-HENRI intégrée
         Les représentations d'une cinétique enzymatique michaelienne

2. Le contrôle des flux métaboliques 185
   2.1. Les coefficients de contrôle des flux 185
      2.1.1. Introduction et historique 185
      2.1.2. Etat stationnaire 187
      2.1.3. Définitions 188
      2.1.4. Détermination des coefficients de contrôle 189
         Méthode
         Exemple 1
         Exemple 2
         Exemple 3
         Limitation à l'usage des inhibiteurs
      2.1.5. Relation de sommation 194
         Conséquences de la relation de sommation
         Application
      2.1.6. Conclusion 195
   2.2. Coefficients d'élasticité 195
      2.2.1. Introduction 195
      2.2.2. Définition : coefficient d'élasticité 196
      2.2.3. Détermination des coefficients d'élasticité dans quelques cas simples 197
      2.2.4. Relations de connexion avec les coefficients de contrôle des flux 197
      2.2.5. Cas de 2 étapes consécutives 199
         Variation des coefficients de contrôle de flux et des élasticités
         Détermination des coefficients de contrôle
         Cas d'une première étape irréversible
         Cas de la deuxième étape irréversible
      2.2.6. Conclusion 200

3. Conclusion générale et perspectives 200

Références 201

Annexe - Principales linéarisations de l'équation de MICHAELIS-HENRI 204
Jean-Pierre MAZAT
A1. Linéarisation de LINEWEAVER et BURK 205
A2. Linéarisation d'EADIE-HOFSTEE 205
A3. Linéarisation de HANES-WOOLF 205
A4. Précision des expressions linéarisées 206

VIII - ELÉMENTS D'ÉLECTROPHYSIOLOGIE 207
Alain BARDOU

1. Des origines au concept de potentiel d'action 207

2. La théorie ionique du potentiel transmembranaire de HODGKIN et HUXLEY 214
2.1. Le courant potassique 215
2.2. Expériences de voltage-clamp et modifications associées du modèle théorique 216
2.3. Le courant sodique 217
2.4. Evolution des constantes de temps avec la dépolarisation 219

3. Du voltage-clamp au patch-clamp 220

4. Conclusions et perspectives 224

Références 225

IX - ELÉMENTS DE PHYSIOLOGIE ET DE PHYSIOPATHOLOGIE CARDIAQUE 227
Alain BARDOU

1. Extension de la theorie d'HODGKIN-HUXLEY à la cellule cardiaque 227

2. Genèse et propagation de l'excitation dans le cœur 232

3. De la propagation des potentiels d'action à l'électrocardiogramme
Présentation de quelques arythmies cardiaques 236
3.1. Arythmies sinusales 238
3.2. Blocs affectant la conduction auriculo-ventriculaire 238
3.3. Tachycardies d'origine ectopique 241
3.4. La fibrillation auriculaire ou ventriculaire 242

4. Conclusions et perspectives 244

Références 245

Annexe - Simulation d'ondes de propagation et fibrillation ventriculaire 247
Alain BARDOU

X - ELÉMENTS DE NEUROPHYSIOLOGIE 253
Patrick MOUCHET

1. Introduction 253

2. Le neurone 254
2.1. Principales caractéristiques 254
2.1.1. Morphologie 254
2.1.2. Autres caractéristiques des neurones 258

2.2. Propriétés électriques des neurones 258
2.2.1. Structure électrotonique 258
2.2.2. Phénomènes régénératifs 261

3. Communications entre neurones 264
3.1. Synapses et fonctionnement synaptique 264
3.1.1. Position et morphologie des synapses 264
3.1.2. Les différentes familles de neurotransmetteurs 265
3.1.3. Processus de libération et récepteurs des neurotransmetteurs 268
3.1.4. Fixation aux récepteurs 270
Spécificité de la fixation
Quelques caractéristiques des récepteurs aux neurotransmetteurs
3.2. Conséquences de la transmission synaptique 272
3.2.1. Potentiels post-synaptiques 272
3.2.2. Intégration dendritique des informations reçues par le neurone 273
Intégration en mode passif
Intégration en mode régénératif
3.2.3. Plasticité synaptique 275
Modifications à court terme
Modifications à long terme

4. Quelques propriétés des ensembles de neurones 277
4.1. Fonctionnement collectif des groupes de neurones 277
4.2. Formes et rôles de la connectivité neuronale 278
4.3. Connectivité courte 278
4.4. La connectivité longue et son articulation avec la connectivité courte 280

5. Conclusions et perspectives 283

Principales abréviations 284

Références 284

Annexe - Rôle fonctionnel de la connectivité et des coordinations neuronales dans un système sensoriel : exemple du premier relais des voies olfactives 286
Patrick MOUCHET

GLOSSAIRE 291

INDEX 315

TABLE DES MATIÈRES 321

Imprimé en France.- JOUVE, 11 bd de Sébastopol, 75001 PARIS - FRANCE
N° 327073L. Dépôt légal : Juin 2003